



# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Instituto de Medicina Preventiva e Saúde Pública

### **HPV como co-factor da Carcinogénese do Pulmão**

Isabel Ferreira de Almeida

#### **Orientado por:**

Professora Doutora Maria Clara Gomes da Fonseca

Pedro Bicho

#### **Co-Orientado por:**

Telma Chantal Almeida Sequeira

**MAIO'2022**



## **Resumo**

O cancro do pulmão é a principal causa de morte por cancro no mundo. No entanto, a epidemiologia dos diversos tipos de neoplasias do pulmão é extremamente heterogénea. A existência de diferentes cofatores, em particular ambientais, tais como a nutrição, o tabagismo, o microbioma e o viroma, podem explicar algumas destas discrepâncias.

A incidência do cancro do pulmão e a sua mortalidade justificam a pesquisa de cofatores de carcinogénese que possam vir a ter impacto terapêutico ou prognóstico.

Alguns agentes ambientais são bem conhecidos como carcinogénicos na história natural de diversas neoplasias, sendo o Vírus do Papiloma Humano um exemplo hegemónico. Trabalhos recentes sugerem que o HPV pode ter um papel independente na carcinogénese do pulmão, alterando vias de desenvolvimento, expressão de marcadores tumorais, resposta terapêutica e, em última instância, prognóstico.

O propósito deste trabalho é apresentar uma revisão da literatura atual relativamente ao papel do viroma na patogénese do cancro do pulmão, focando a participação do HPV.

**Palavras-Chave:** Cancro do Pulmão, Viroma, HPV.

**O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.**

## **Abstract**

Lung cancer is the leading cause of cancer death in the world. However, the epidemiology of various types of lung malignancies is extremely diverse. The existence of distinct co-factors, such as nutrition, smoking, the microbiome and the virome, might explain these discrepancies.

The association between the incidence of lung cancer and its mortality justifies the study and search of co-factors of carcinogenesis that might be impactful on therapeutics and prognosis.

Some environmental agents are well-known for their roles in the natural history of many different malignancies, with Human Papilloma Virus being a prime example. Recent data suggests that HPV may have an independent role in lung cell carcinogenesis, potentially altering development pathways, tumor marker expression, therapeutic response and, ultimately, prognosis.

The aim of this work is to present an updated literature review on the role of the virome on lung cancer pathogenesis, with particular focus on HPV participation.

**Key Words:** Lung cancer, Virome, HPV.

**This dissertation is the sole responsibility of its author and FMUL is not responsible for the content presented.**

## Índice

Abreviaturas e Acrónimos	<b>6</b>
Cancro do Pulmão	<b>7</b>
Fatores de Risco e Co-fatores da Carcinogénese do Pulmão	<b>16</b>
Vírus do Papiloma Humano	<b>20</b>
HPV na Carcinogénese do Pulmão	<b>26</b>
Conclusão	<b>33</b>

## Abreviaturas e Acrónimos

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ARNm - Ácido Ribonucleico Mensageiro

CPNPC - Cancro do Pulmão de Não Pequenas Células

CPPC - Cancro do Pulmão de Pequenas Células

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica

EBV - Vírus Epstein-Barr

EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor

EMT - Transição Epitélio-Mesênquima

FHIT - Fragile Histidine Triad Diadenosine Triphosphatase

FOXM1 - proteína *Foxhead box M!*

HDAC - Complexo E2F/pRb/deacetilase das histonas

HIF-1 - Fator induzível pela hipóxia 1

HPV - Vírus do Papiloma Humano

HSPG - Proteoglicanos de Sulfato de Heparano

hTERT - Transcriptase Reversa da Telomerase Humana

Mcl-1 - Proteína de Diferenciação Celular de Leucemia Mielóide Induzida

MMP-2 e MMP-9 - Metalopeptidases da Matriz 2 e 9, respetivamente

OMS - Organização Mundial de Saúde

PET - Tomografia por Emissão de Positrões

pRb - Proteína Supressora do Retinoblastoma

RT-PCR - Reação de Transcrição Reversa em Tempo Real

SIADH - Syndrome of Inappropriate Antidiuretic Hormone Secretion

SNC - Sistema Nervoso Central

TC - Tomografia Computorizada

TIMP-3 - Inibidor Tecidual de Metaloproteínas 3

TKI - Inibidor de tirosina-cinase

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## Cancro do Pulmão

O cancro do pulmão é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um tumor que tenha origem no epitélio respiratório, seja brônquios, bronquíolos ou alvéolos.

Avanços significativos na compreensão da fisiopatologia da doença, na identificação de biomarcadores com valor prognóstico e aperfeiçoamento terapêutico resultaram em progressos significativos na sobrevida, no entanto, a muito elevada taxa de mortalidade do cancro do pulmão justifica estudos adicionais nesta área.

## Epidemiologia

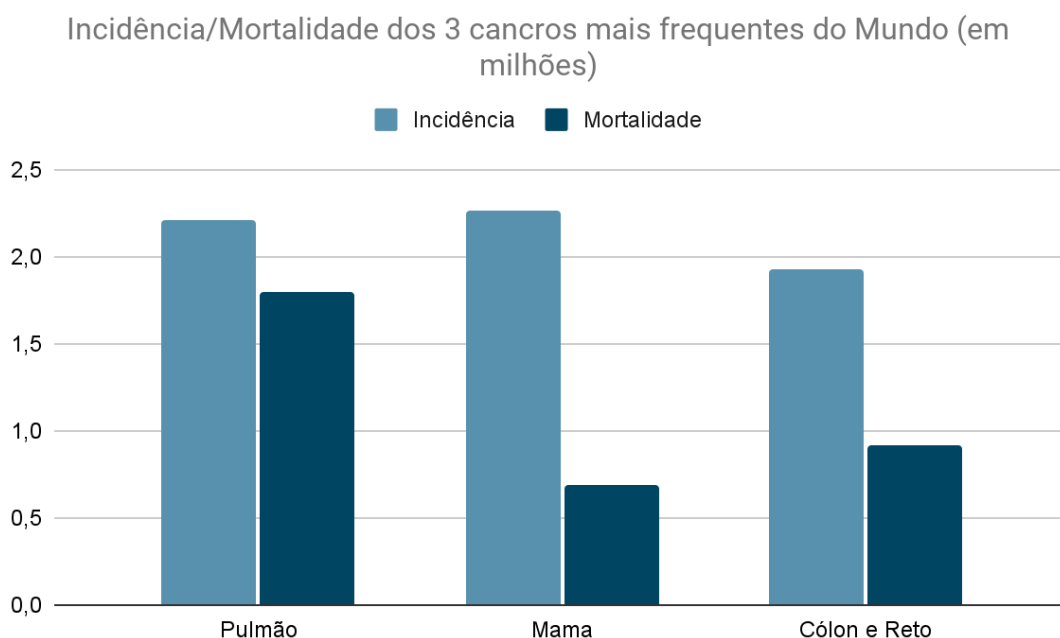


Figura 1 - Gráfico com Incidência/Mortalidade dos 3 cancros mais frequentes do mundo em 2020, segundo *Cancer*. (2022, February 3). WHO.

Retirado a 2 Maio 2022 de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

A incidência do cancro do pulmão é de cerca de 2 milhões de casos por ano, com uma mortalidade de 1.79 milhões de mortes anuais, tornando-se a principal causa de morte por cancro no mundo.<sup>1</sup>

Intervenções na saúde pública para reduzir a taxa de tabagismo resultaram numa diminuição da incidência do cancro do pulmão e em maiores sobrevidas. No entanto, a incidência desta neoplasia está a reduzir cerca de duas vezes mais rapidamente em

homens que em mulheres, o que poderá ser explicado por taxas inferiores de cessação tabágica em mulheres.<sup>2</sup>

É relevante destacar que existem muitas outras disparidades na incidência de cancro do pulmão. Relativamente à distribuição geográfica, sabemos que o número de diagnósticos de cancro do pulmão está a aumentar em países de baixos rendimentos, onde técnicas de diagnóstico e tratamento são mais inacessíveis à população.<sup>3</sup>

### **Não fumadores**

O conceito de "não fumador" define-se como alguém que fumou menos de 100 cigarros na sua vida. Não fumadores contribuem para cerca de 25% dos casos de cancro do pulmão globalmente, e no Sudeste Asiático este número pode atingir os 80%.<sup>4</sup> Em conformidade, estatísticas atuais estimam que cerca de 15% dos cancros do pulmão em homens e mais de 50% em mulheres não estejam relacionados com o tabaco. Tanto estes dados como as tendências na incidência de neoplasia do pulmão, revelam um grande viés relativamente ao género na epidemiologia desta doença.<sup>5</sup>

### **Classificação Histológica**

As neoplasias do pulmão são muito diversas na sua apresentação, sendo habitualmente diferenciadas pelas suas características histológicas. O sistema de classificação da OMS propõe quatro tipos de cancro baseados nos quatro principais tipos de células: cancro de pequenas células, adenocarcinoma, carcinoma pavimentoso e carcinoma de grandes células. Devido à abordagem terapêutica, a classificação mais utilizada faz somente a distinção entre cancro do pulmão de pequenas células (CPPC), com 15% do total de diagnósticos e cancro do pulmão de não pequenas células (CPNPC), responsável por 85% dos casos. Com efeito, o CPNPC vai incluir o adenocarcinoma, o carcinoma pavimentoso e o carcinoma de grandes células.<sup>6</sup> Entre CPNPC, os mais frequentes são os adenocarcinomas, seguidos dos carcinomas pavimentoso<sup>7</sup>, no entanto é mais vantajoso fazer apenas a distinção entre CPNPC pavimentoso ou não pavimentoso, uma vez que é a distinção que terá maior impacto na decisão terapêutica.<sup>8</sup>

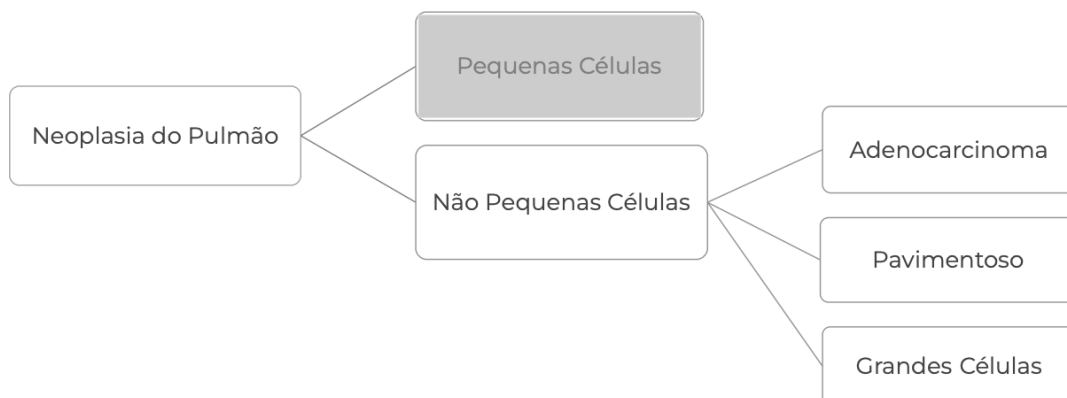


Figura 2 - Esquema a demonstrar classificação histológica das neoplasias do pulmão

À observação histológica, o CPPC caracteriza-se por pequenas células com citoplasma escasso, limites indefinidos, cromatina granular no núcleo, tornando o nucléolo indistinto, e alta atividade mitótica. Os adenocarcinomas apresentam uma aparência glandular, podendo apresentar combinações de vários padrões glandulares, como o produtor de mucina, acinar, papilar ou sólido. Os carcinomas pavimentosos são identificados pela queratinização ou pela presença de pontes intercelulares do epitélio brônquico. Os carcinomas de grandes células são os mais raros, e distinguem-se por não apresentarem as características histológicas de nenhum dos grupos anteriores.<sup>8</sup>

### **Etiologia e Fatores de Risco**

O tabaco é a principal causa de cancro do pulmão, sendo que a exposição mantida aumenta o risco e que a cessação o diminui. Devido a esta importante relação, considera-se que um indivíduo de alto risco para cancro do pulmão é do sexo masculino, com idade  $\geq 45$  anos e com história de tabagismo, apesar de que algumas variações epidemiológicas, particularmente em relação ao sexo, poderão vir a condicionar esta definição.

O tabaco aumenta a probabilidade de desenvolvimento de cancro do pulmão de qualquer tipo, no entanto existe uma associação particularmente forte entre alta carga tabágica e os carcinomas pavimentosos e de pequenas células. Em contrapartida, os adenocarcinomas são a forma mais frequente em não fumadores.<sup>8</sup>

Foram descritos outros fatores de risco para a carcinogénese do pulmão, como exposições ocupacionais (asbestos, arsénio, crómio, gás mostarda, níquel e

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), radiação ionizante e algumas patologias pulmonares, como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC).

Além de fatores ambientais, existe também a possibilidade de uma predisposição genética para o desenvolvimento de cancro do pulmão, inclusive o impacto dos diferentes carcinogéneos é condicionado por polimorfismos. O paradigma da influência genética é o polimorfismo CYP1A1 do citocromo P450, que aumenta o risco para cancro do pulmão. Os polimorfismos são relativamente frequentes na população, como a sua própria definição o demonstra, no entanto a sua contribuição individual para a carcinogénese é habitualmente baixa.<sup>8</sup>

### **Fisiopatologia**

Segundo Hanahan e Weinberg, todas as células neoplásicas devem sofrer, por indiferente ordem, seis eventos celulares: independência de fatores de crescimento, ausência de resposta a mecanismos anti-proliferativos, evasão à apoptose, aquisição de potencial replicativo ilimitado, angiogénese mantida e invasão tecidual e metastização. No caso particular da neoplasia do pulmão, a sequência dos diferentes eventos celulares varia muito de acordo com o tipo de cancro do pulmão, tornando pouco profícuo estudar esta patologia como uma unidade.<sup>10</sup> Outra dificuldade prende-se ao facto de não existirem certezas quanto à origem das neoplasias do pulmão.

As *driver mutations* mais associadas ao cancro do pulmão estão associadas aos genes *ras*, *myc*, *rb*, *bcl-2*, a família de genes ERBB (que inclui o EGFR e o Her-2/neu), a região de genes FHIT e a anomalias da p53. Os genes *myc* são dos primeiros grupos de oncogenes a estarem constitutivamente ativados tanto no CPPC como no CPNPC e as alterações da p53 e do gene *ras* associam-se particularmente a carcinomas invasivos.<sup>11</sup>

Estas *driver mutations* têm alguns aspetos em comum. Todas elas resultam da ativação constitutiva de vias dependentes de tirosina-cinases e aparentam ser eventos-chave precoces na carcinogénese, mantendo-se presentes ao crescimento tumoral. Devido a estas semelhanças é possível recorrer a agentes terapêuticos que atuam como inibidores de tirosina-cinases (TKI).<sup>6</sup> Existe, no entanto, resistência a estes agentes, seja resistência *on-target*, *off-target* ou transformações fenotípicas.

## **Biomarcadores**

A pesquisa de biomarcadores tem sido uma das novas apostas no estudo do cancro do pulmão e tem como objetivo detetar marcadores com potencial diagnóstico, preditivo de prognóstico e especialmente com potencial de alvo terapêutico. Seguem-se alguns dos marcadores que tem maior relevância neste momento.

### *Expressão de PD-L1*

O PD-L1 pode ser expresso na superfície de certos CPNPC, no entanto, intratumoralmente a expressão pode também ser heterogénea, dificultando a sua deteção em pequenas amostras. Quando este biomarcador é expresso, pode justificar-se o uso de anticorpos anti-PDL1 como opção terapêutica. Curiosamente, determinados tumores que não expressam este marcador respondem a este tipo de terapêutica.<sup>6</sup>

### *Estudo molecular*

Todos os doentes com diagnósticos recentes de adenocarcinoma avançado do pulmão devem ser testados para mutações do gene EGFR, para rearranjos dos genes ALK, ROS-1 e RET, para a mutação BRAF Val600Glu e para *skipping mutations* do gene MET.<sup>12</sup>

Certas mutações estão mais associadas à história tabágica, como as mutações BRAF, KRAS ou a amplificação do MET.<sup>13</sup> No entanto, é importante lembrar que estas *driver mutations* podem estar presentes em todas as histologias, todos os perfis tabágicos e todos os grupos epidemiológicos.

## **Manifestações Clínicas**

Uma vez que a maioria dos cancros do pulmão são diagnosticados já em estadios avançados, apenas uma minoria destas neoplasias vai ser detetada em doentes assintomáticos.<sup>8</sup>

A clínica desta doença varia muito de acordo com a localização do tumor. Assim, tumores centrais manifestam-se habitualmente por tosse e dispneia, e ocasionalmente por hemoptises, devido às suas relações com as vias aéreas. À auscultação podem ouvir-se sibilos unilaterais ou estridor, dependendo a que altura da via aérea se

encontra a massa tumoral. Os tumores periféricos têm como manifestações mais frequentes a dor tipo pleurítica e o derrame pleural.<sup>8</sup>

As manifestações clínicas da maioria dos cancros podem ser divididas pelo mecanismo fisiopatológico de base. O crescimento e a invasão regional justificam sintomas como obstrução da via aérea, disfagia e disfonia, e algumas síndromes particulares, como a Síndrome de Horner e a Síndrome da Veia Cava Superior. Por outro lado, manifestações sistémicas podem ter como base metastização à distância, síndromes paraneoplásicas ou a própria natureza consumptiva do cancro.<sup>8</sup>

<b>Fisiopatologia</b>	<b>Sinais e Sintomas</b>
<b>Lesão primária</b>	Tosse, dispneia, hemóptises, estridor, sibilância, dor, derrame pleural
<b>Crescimento/Invasão Local</b>	Rouquidão, estridor, disfagia, Síndrome de Horner, Síndrome de Pancoast, Síndrome da Veia Cava Superior
<b>Metastização Extratorácica</b>	Suprarrenal (+ assintomática), Cerebral (cefaleia, náuseas e vômitos, sinais focais, convulsões), Óssea (compressão espinhal, fraturas, dor), Medula Óssea (citopénias, leucoeritroblastose), Hepática (anorexia, febre, hepatomegália)
<b>Síndromes Paraneoplásicas</b> . Sintomas constitucionais . Síndromes endócrinas . Cutâneas . Hematológicas  . Neuro-miopáticos  . Renal . Tecido conjuntivo	[++CPPC]  . Anorexia, diaforese, febre, fraqueza, perda ponderal . Hipercalcémia, SIADH, ginecomastia . Acantose <i>nigricans</i> . Anemia, granulocitose, leucoeritroblastose, endocardite marântica, síndrome de Trousseau . Degeneração cortical ou cerebelar, Síndrome de Eaton-Lambert, polimiosite . Glomerulonefrite, síndrome nefrótico . Hipocratismo digital, osteoartropatia hipertrófica primária

Tabela 1 - Sinais e sintomas do Cancro do Pulmão (nota: esta tabela não pretende expor de forma exhaustiva as manifestações clínicas desta neoplasia, mas sim ilustrar a sua diversidade)

Alguns quadros são tão sugestivos de neoplasia do pulmão que perante a sua apresentação deve ser feito um estudo sistemático e rigoroso, mesmo perante uma radiografia de tórax sem alterações: tosse crónica num doente com idade superior a 40

anos, com história de tabagismo ou DPOC; pneumonia refratária a múltiplos ciclos de antibioterapia; sibilos isolados num adulto.<sup>8</sup>

## **Rastreios**

A baixa taxa de sobrevivência do cancro do pulmão é frequentemente atribuída a diagnóstico tardio, dado que a maioria destas neoplasias é diagnosticada em estadio III ou IV. Outro argumento a favor desta suposição será o facto de quando identificado em estadio precoce, o cancro do pulmão tem bom prognóstico.<sup>14</sup> Um diagnóstico precoce está dependente de rastreios, vigilância e diagnóstico.

Antigos estudos randomizados concluíram que o radiografias de tórax de rastreio, com ou sem exame citológico da expectoração associado, não tinham impacto na mortalidade por cancro do pulmão em doentes de alto risco.<sup>15</sup> Em oposição, tomografias computadorizadas (TC) do tórax de baixa dose sem contraste foram consideradas eficazes para rastrear neoplasia do pulmão em indivíduos de alto risco.<sup>16</sup>

É, no entanto, relevante notar que estudos como o *National Lung Screening Trial* ou o NELSON study que servem de base para estas conclusões são essencialmente baseados em achados em homens caucasianos.<sup>6</sup> É pertinente aumentar a abrangência dos estudos, uma vez que não só a mortalidade por cancro do pulmão parece afetar desproporcionalmente as minorias étnicas, como as mulheres são sempre uma pequena percentagem da população em estudo, mesmo existindo evidência de poderão beneficiar mais de testes de rastreio.<sup>17, 18</sup> Outro ponto que merece atenção são os fatores de risco abrangidos, sendo que frequentemente o tabagismo é o único considerado.

Apesar de se ter mostrado de fulcral importância na gestão de outras neoplasias, o rastreio ainda não é muito valorizado no cancro do pulmão, apesar de existir evidência de que a mortalidade por esta neoplasia é diminuída por rastreio atempado. Esta conduta poderá estar a contribuir para que os avanços terapêuticos sejam a única vertente a alterar a mortalidade por cancro do pulmão neste momento.<sup>19</sup>

## **Diagnóstico**

O diagnóstico de cancro do pulmão implica uma amostra tumoral, que deverá ser em quantidade suficiente para uma classificação e caracterização tumoral mais precisa. Em

casos de doença metastática, uma amostra de metástase poderá ser preferida a uma amostra do tumor original. É pertinente lembrar que a maioria dos tumores são altamente heterogêneos, pelo que uma amostra pequena poderá não refletir o dinamismo ou a totalidade das características do tumor. Essa é uma das razões pelas quais a citologia da expectoração, apesar de menos invasiva, não é preferida.<sup>20, 21</sup>

A biópsia tumoral pode ser obtida por broncoscopia, aspiração por agulha fina ou biópsia percutânea guiada por técnica de imagem. O método escolhido habitualmente depende da localização da lesão: em lesões centrais a broncoscopia é o *Gold Standard*, enquanto que em lesões periféricas, uma biópsia guiada transtorácica é preferida. Em casos de derrame pleural, é necessária toracocentese.<sup>20</sup> Tipicamente o resultado da biópsia é suficiente para distinguir CPPC de CPNPC, contudo a diferenciação entre os tipos de CPNPC é mais difícil.

Devido à natureza invasiva das biópsias tradicionais, outros métodos diagnósticos têm sido investigados. As diferentes formas de biópsias líquidas poderão satisfazer essa necessidade, não só pela sua acessibilidade como pela variedade de métodos. As biópsias líquidas podem basear-se em células tumorais circulantes, em ácido desoxirribonucleico (ADN) tumoral circulante, em microRNA, em achados da metilação do ADN, em exomas circulantes ou em ADN microbiano. Este último método é particularmente interessante, uma vez que implica que microrganismos participem no desenvolvimento tumoral.<sup>22</sup> Esta hipótese é suportada por assinaturas microbianas exclusivas encontradas em tecido tumoral.<sup>23</sup>

## **Estadiamento**

O estadiamento do cancro do pulmão implica estadiamento anatómico, com aferição da localização e da presença de metástases, e estadiamento fisiológico, que analisa o estado geral do doente e a sua capacidade para suportar tratamentos antitumorais.<sup>8</sup>

A primeira decisão do estadiamento é perceber que doentes são operáveis e que doentes não são operáveis, e dentro deste último grupo decidir quem beneficia de

quimioterapia, radioterapia ou ambas. Estas decisões aplicam-se em particular ao CPNPC, uma vez que o CPPC é tipicamente irressecável.<sup>8</sup>

Todos os tipos de CPNPC deverão ser avaliados por TC e por tomografia por emissão de positrões (PET). A PET é capaz de detetar nódulos com atividade metabólica inferiores a 1 centímetro, mas nunca deverá ser utilizada individualmente por não ser muito precisa anatomicamente. As grandes vantagens desta técnica são a deteção de nódulos mediastínicos e metástases à distância, permitindo um estadiamento mais preciso.<sup>6</sup> O restante estadiamento irá depender de análise tecidual e da existência e localização de metástases.

## **Abordagem**

### *CPNPC em estadio inicial*

A resseção cirúrgica é o paradigma do tratamento do cancro do pulmão nos estadios I, II e IIIA. A cirurgia poderá ser videoassistida ou uma toracotomia aberta, com preferência atual pelo primeiro método, uma vez que demonstrou mais baixa morbilidade com resultados similares a longo prazo.<sup>24</sup>

Em casos de CPNPC estadio I em que o doente não possa ser operado, radioterapia fracionada poderá ser considerada. Em casos de estadio II, IIIA e em alguns casos de estadio IB, a adição de quimioterapia adjuvante deverá ser considerada.<sup>6</sup>

### *CPNPC metastático*

Algumas mutações são particularmente relevantes para a abordagem terapêutica do CPNPC metastático.

Mutações no gene EGFR são *driver mutations* frequentes em adenocarcinomas e podem predizer a resposta a determinados inibidores de tirosina-cinases. Sabe-se que deleções do exão 19 e que a mutação Leu858Arg do exão 21 constituem a maioria das mutações somáticas do EGFR e que estão associadas a sensibilidade aos TKI. Por outro lado, a mutação no exão 20 está ligada a resistência aos TKI.<sup>25</sup> Atualmente, e por terem sido descritas vários casos de resistência, existem três gerações de TKI. O Osimertinib, um TKI de terceira geração, aumentou a sobrevida geral e tem melhor ação no sistema nervoso central (SNC) quando comparado com gerações anteriores.<sup>26</sup>

Rearranjos anormais do gene ALK são outros do alvos de alguns tipos de TKI. O Crizotinib foi o primeiro ALK-TKI, tendo tido resultados promissores.<sup>27</sup> As novas gerações de ALK-TKI atingem o SNC, são mais potentes e ultrapassam algumas das resistências previamente identificadas, chegando à atual terceira geração com amplo espectro contra resistências.<sup>28</sup>

Algumas outras mutações podem estar implicadas no tratamento do CPNPC metastático, sendo que algumas delas já são identificadas como alvos, como o HER2 (ou ERBB2) ou KRAS.<sup>6</sup> Simultaneamente, alguns *checkpoints* imunes foram visados como alvos terapêuticos. No caso do CPNPC, dois *checkpoints* imunes são particularmente relevantes: o CTLA-4 e o PD-1. O CTLA-4 é expresso em linfócitos T CD4 + e CD8 + e inibe a ativação de células T. O PD-1 pode ser expresso por células T, B ou *natural killers*, sendo responsável pela tolerância imune central e periférica. Estes achados determinantes, uma vez que se pensava que o CPNPC era muito pouco imunogénico, estes alvos foram superiores à quimioterapia.<sup>6,29</sup>

#### *CPPC*

O CPPC é conhecido pela sua rápida progressão, a sua propensão para metastização e consequente mau prognóstico. O comportamento deste tumor explica o diferente estadiamento: CPPC em estadio limitado, onde a neoplasia está restrita ao hemitórax, sendo considerada curável; e CPCC em estadio avançado, onde a neoplasia ultrapassa o hemitórax e exige quimioterapia, imunoterapia ou radioterapia.<sup>6</sup>

Por até à data não ter sido encontrada relação entre CPPC e a infeção por HPV, considerou-se que não seria pertinente para este trabalho uma maior elaboração sobre este tipo de cancro do pulmão.

## **Fatores de Risco e Co-fatores da Carcinogénese do Pulmão**

Muitos aspectos da epidemiologia e etiologia do cancro do pulmão permanecem por esclarecer. Sabe-se que o tabagismo é o fator de risco mais importante para o cancro do pulmão, no entanto, a grande maioria dos fumadores não irá desenvolver esta neoplasia. Adicionalmente, cerca de 25% dos cancros do pulmão surgem em não-fumadores.<sup>4</sup> Com a prevalência do tabagismo a diminuir nos países industrializados e com o aumento da incidência de cancros do pulmão em não fumadores, é mais importante que nunca compreender melhor que outros fatores etiológicos ou de risco poderão ter um papel na carcinogénese do pulmão.<sup>9</sup>

Com o conhecimento de que a nutrição e as exposições ambientais têm um papel no desenvolvimento do cancro do pulmão, optou-se por detalhar apenas os fatores infecciosos para o âmbito deste trabalho.

### **Bioma e Infeções**

As infeções não são uma novidade como fator de risco neoplásico, afinal pensa-se que os agentes infecciosos são responsáveis por 14.4% dos cancros do mundo, com os vírus a contabilizar a maioria destes casos.<sup>31</sup> Não obstante, o seu papel na maioria dos casos não é bem compreendido.

Mais recentemente conjecturou-se que o microbioma poderia também estar implicado na carcinogénese. De facto, verificou-se que a composição microbiana é diferente em doentes com cancro, que biofilmes podem ser responsáveis por alterações genéticas e epigenéticas e que microrganismos específicos têm um papel no desenvolvimento de certas neoplasias.<sup>32</sup>

### **Microbioma e Infeções bacterianas**

O pulmão saudável contém uma quantidade muito pequena de massa microbiana, não sendo estéril como previamente se pensava. Na verdade, o microbioma do pulmão é muito distinto em quantidade e comportamento relativamente ao microbioma de outros órgãos.<sup>33</sup>

O estudo do microbioma baseia-se em técnicas de sequenciação. Não só não seria prático recorrer a culturas bacterianas, mas também pouco correto, uma vez que

implicaria considerar apenas agentes expectáveis, conhecidos ou que cresçam em condições passíveis de serem controladas. Por estas razões, o microbioma é mais frequentemente estudado por técnicas de amplificação de PCR e por sequenciação, usando regiões do ADN que são conhecidas como específicas de bactérias, como o 16S rRNA.<sup>34</sup> As amostras de microbioma são habitualmente obtidas por um de dois métodos: por colheita de expectoração ou por lavado broncoalveolar. A expectoração pode ser obtida por técnicas não invasivas, mas o lavado broncoalveolar está menos suscetível a contaminação.<sup>33</sup>

O microbioma do pulmão saudável é constituído maioritariamente pelo géneros *Prevotella*, *Streptococcus*, and *Veillonella* e hipotetiza-se que este bioma deriva da microaspiração de microrganismos do trato respiratório superior.<sup>35, 36</sup> O impacto patológico destes microrganismos ainda não é conhecido. Evidência atual sugere que o microbioma do pulmão regula a resposta imune, favorece o desenvolvimento imunitário e tolerância. Por exemplo, a diversidade bacteriana em pulmões de modelos animais correlacionava-se inversamente aos níveis de IL-1 $\alpha$  e IL-4.<sup>37</sup>

Adicionalmente, conjectura-se que a disbiose do pulmão possa ter um papel patológico. Por exemplo, é conhecido que a colonização do trato respiratório superior precede pneumonias. A predominância de certas *taxa* na expectoração ou no lavado foi associada ao cancro do pulmão,<sup>38</sup> com o enriquecimento de alguns tipos de bactérias a ser associado a infiltração por células inflamatórias ou aumento da via PI3K/ERK.<sup>33</sup>

Tecidos neoplásicos também demonstraram presença de microbioma pulmonar alterado quando em comparação com tecidos saudáveis,<sup>39</sup> com algumas especificidades para CPPC e para CPNPC.<sup>40</sup> Além do seu possível papel na carcinogénese, alguns dos padrões microbianos foram associados a recorrência e a influência na sobrevida livre de doença, e até com mutações específicas no carcinoma pavimentoso do pulmão.<sup>39, 41</sup>

Conclui-se que existe uma associação entre cancro do pulmão e o microbioma pulmonar, havendo sugestões relativamente aos mecanismos por trás desta relação, no entanto, sem umnexo de causalidade a suportar estas associações, saber se a disbiose tem implicações na carcinogénese pulmonar permanece por esclarecer.

Relativamente às infeções, o cancro do pulmão está associado a inflamação crónica da via aérea, particularmente em não-fumadores.<sup>33</sup> Consequentemente, infeções que são tipicamente associadas a níveis mais elevados de inflamação são consideradas como suspeitas na relação com a carcinogénese. Por exemplo, a infeção por *Chlamydomphila pneumoniae* foi ligada relacionada com lesão do ADN e lesão celular, providenciado vias para a carcinogénese.<sup>42</sup> A tuberculose foi outra infeção associada a um aumento de risco para cancro do pulmão, mesmo quando ajustada a possíveis agentes confunditórios.<sup>43</sup>

São necessários mais estudos para compreender se estas infeções são agentes oncogénicos ou se apenas como qualquer estado inflamatório prolongado, facilitam a replicação celular e consequentes mutações genéticas.

### **Viroma e infeções virais**

Comparando com o microbioma pulmonar, o viroma do pulmão é menos conhecido. Os vírus não apresentam regiões conservadas típicas, como o 16S bacteriano. Como consequência, o estudo dos vírus implica sequências específicas para vírus já conhecidos, perdendo-se a vantagem de uma detecção mais abrangente. Isto implica que muitas sequências *shotgun* não irão emparelhar com qualquer material conhecido, provavelmente pertencendo a vírus ainda por descobrir, ou seja à matéria negra metagenómica.<sup>33</sup>

Os vírus *Anelloviridae* são os vírus predominantes no viroma pulmonar, com os *Redondoviridae* a serem os segundos mais frequentes.<sup>44, 45</sup> Alguns vírus bastante conhecidos são comuns no bioma do pulmão (herpesvirus, papillomavirus, retrovírus...)<sup>44, 46</sup>

Foi descoberto que alguns tumores humanos são hospedeiros de certas espécies de vírus. Alguns destes vírus estão presentes desde os passos iniciais da carcinogénese e constantemente detetados em células neoplásicas, sugerindo que, em alguns casos, a infeção viral pode ser um evento central no desenvolvimento de cancro.<sup>47</sup> Alguns vírus foram mesmo reconhecidos como oncogénicos, tais como o vírus da leucemia das células T humano, o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus herpes-8 e o vírus do papiloma humano (HPV).

Não obstante, por causa de vários aspetos fundamentais da biologia viral, identificar agentes virais como oncogénios é difícil. Um dos desafios é estudar e identificar os próprios vírus, uma vez que as tecnologias de sequenciação apropriadas são caras e pouco acessíveis. As bases de dados relativamente aos vírus são também muito menos exaustivas que as relativas a bactérias e fungos. Ademais, os marcadores de exposição a vírus são difíceis de avaliar durante a carcinogénese, uma vez que existe frequentemente um grande intervalo de tempo entre infeção e desenvolvimento de cancro.

A interferência viral na carcinogénese do pulmão é um pensamento tentador, uma vez que pode oferecer alguma compreensão adicional da história natural do cancro do pulmão, dos seus eventos celulares cardinais e de novos possíveis alvos terapêuticos. A principal vantagem seria, no entanto, o potencial de prevenir o aparecimento de cancro do pulmão ao prevenir a infeção.<sup>48</sup>

Já tinha sido sugerido o envolvimento de alguns vírus no desenvolvimento do cancro do pulmão, especificamente o HPV, o EBV e, em menor grau, o Simian Virus 40.<sup>49, 50, 51</sup> De igual modo, análises bioinformáticas demonstraram sequências virais em 21% dos cancros do pulmão, suportando esta conjectura.<sup>52</sup> No entanto, os achados relativos a este tema são inconsistentes.

Em suma, apesar de ser provável que as infeções tenham um papel na carcinogénese do pulmão, a evidência de uma associação causal continua omissa.

## Vírus do Papiloma Humano

Tema exclusivamente baseado em Bicho, M., C. (2022) 44. Papilomavírus. *Microbiologia Médica - Volume 2*. Lidel

Os papilomavírus são vírus icosaédricos sem invólucro de ADN de cadeia dupla com aproximadamente 8000 pares de bases.

Estes vírus pertencem à família *Papillomaviridae*, podendo distribuir-se pelos géneros Alfa, Beta, Gama, Mu ou Nu, caso sejam papilomavírus humanos, ou noutros géneros caso sejam papilomavírus animais.

Os papilomavírus têm uma distribuição ubíqua e tropismo para diversos epitélios.

Uma onda de interesse nesta família viral surgiu no final do século XX, com a confirmação de que o HPV seria o principal fator de risco para o cancro do colo do útero.

### Epidemiologia

O papilomavírus é o agente responsável pelo desenvolvimento de condilomas, verrugas vulgares e certos tipos de carcinoma, destacando-se o cancro do colo do útero, cuja relação é melhor estudada.

Estima-se que cerca de 80% das pessoas de ambos os sexos estiveram infetadas por HPV em algum momento das suas vidas. A geografia tem também influência na incidência, com aumento contínuo em países com baixos rendimentos e começando a diminuir em países com mais recursos. Sabe-se ainda que a prevalência está ainda relacionada com a idade, sendo maior em jovens adultos e diminuindo com a idade. Todavia, existem particularidades para alguns tipos, por exemplo, sabe-se que com o aumento da idade, a prevalência de HPV 16 diminui, mas dos tipos 39, 52 e 58 aumenta.

Existem outros determinantes demográficos de risco, como o número de parceiros sexuais, o estado sócio-económico, os grupos étnicos e religiosos. Outras condições moduladoras do risco poderão ser específicas para o tipo de lesões. Por exemplo, o comportamento sexual e fatores obstétricos e ginecológicos influenciam o risco para o cancro do colo do útero em particular.

## Classificação

É possível classificar os HPV em diferentes genótipos com base na sequenciação dos genes E6, E7 e L1, sendo que atualmente estão identificados mais de 130 genótipos de HPV. Alguns subtipos e variantes podem estar associados a determinados grupos étnicos (variantes europeias, asiáticas-americanas, africanas...).

É igualmente possível classificar o HPV com base no tropismo ou no tipo de lesões causadas, podendo ser cutâneos, mucocutâneos ou das mucosas.

Por fim, e talvez a classificação mais impactante a nível clínico, os HPV podem classificar-se com base no risco oncogénico, dividindo-se em genótipos de baixo risco ou não oncogénicos e de alto risco oncogénico.

<b>Tropismo celular</b>	<b>Genótipos de HPV</b>
Cutâneo	1, 4, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 41, 47, 48, 49, 50, 60, 63, 65, 75, 76, 77, 78, 80, 88, 92, 93, 94, 95, 96
Mucocutâneo	2, 3, 7, 10, 26, 27, 28, 29, 30, 34, 40, 43, 51, 53, 54, 56, 57, 61, 62, 64, 66, 67, 73
Mucoso	6, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 52, 55, 58, 59, 61, 62, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 81, 82, 83, 85, 86, 87, 89, 90, 91
<b>Risco oncogénico</b>	<b>Genótipos de HPV</b>
Baixo risco	1-4, 6, 7, 9-15, 17, 19, 20-29, 32, 34, 36-38, 40-44, 46-51, 53-55, 57, 59-63, 65, 71, 72, 74-78, 80, 81, 83, 84, 86-91, 94, 95
Alto risco	5, 8, 12, 14, 16, 18-21, 24-26, 30, 31, 33-36, 39, 45, 47, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, 85, 92, 93, 96

Tabela 2 - Classificação dos genótipos do HPV com base no tropismo celular e no risco oncogénico

Formato com base em tabela encontrada em Bicho, M., C. (2022) 44. Papilomavírus. *Microbiologia Médica - Volume 2*. Lidel

Determinados genótipos são mais associados a determinados tipos de lesões, sendo que os HPV 6 e 11 são os mais prevalentes em patologia anogenital benigna, em particular em condilomas ou lesões de baixo grau. Por outro lado, lesões de alto grau e cancro estão mais implicados os genótipos 16, 18, 45 e 56.

## Fisiopatologia

O genoma do HPV é constituído por ADN circular que é mantido no interior de uma cápside com 72 capsómeros. Estes capsómeros são constituídos pelas proteínas L1 e L2, que são transcritas de uma das três regiões do genoma deste vírus:

- Região E - *early*: constituída pelos genes precoces, numerados de E1 a E8 e que codificam proteínas responsáveis pela replicação e regulação celular. As proteínas E1 e E2 regulam o ciclo viral, E4 interage com o citoesqueleto da célula hospedeira, podendo condicionar a sua lise, E5 participa no início da infeção e na transformação e progressão maligna da célula. E6 e E7 são proteínas virais com papel mais relevante na carcinogénese: a proteína E6 promove a degradação da p53 e a proteína E7 promove a degradação da proteína do retinoblastoma (Rb), pelo que promovem a imortalidade celular. Os mecanismos promovidos pelas proteínas E3 e E8 ainda não são conhecidos.
- Região L - *late*: constituída pelos genes tardios, L1 e L2, que como descrito anteriormente, codificam as proteínas da cápside. L1 é a proteína maior, representando a maioria das proteínas do vírus e é responsável pela adesão celular, sendo também a mais imunogénica.
- Região de controlo: constituída por genes reguladores; esta região separa genes precoces e tardios.

O HPV infeta células das camadas basais dos epitélios da epiderme ou da mucosa. Para atingir esta camada mais profunda, o vírus serve-se de microlesões no epitélio. O ciclo de vida do papilomavírus inicia-se com a sua ligação aos recetores celulares e endocitose. Supõe-se que este vírus se sirva dos recetores sindecan-1 e integrina  $\alpha 6\beta 4$ , que se encontram em maior quantidade em contexto de microlesões.

Nas células basais, o ADN viral será libertado. A sua expressão só se inicia nas camadas superiores, razão pela qual nas células infectadas por HPV existe sempre proliferação excessiva, excepto na camada basal. Esta proliferação poderá ter como consequências a acantose, paraqueratose e hiperqueratose e, em última instância, originar lesões benignas ou malignas. A forma como o papilomavírus se integra na célula será determinante para o *status* da lesão. Caso o ADN viral não se integre nos cromossomas, o vírus irá manter-se numa situação de latência, resultando no máximo

numa lesão benigna. Por outro lado, a infecção por HPV irá controlar o ciclo celular caso o ADN viral integre o ADN celular, potenciando o aparecimento de lesões malignas.

O papilomavírus após infetar a camada basal dos epitélios pode manter-se em latência ou replicar em simultâneo com a diferenciação celular. A infecção por HPV poderá ser resolvida pela ativação do sistema imunitário, que elimina células infetadas. Em determinados casos, o vírus na forma latente ou com baixa infecciosidade pode escapar ao escrutínio imunitário. Este último cenário habitualmente traduz-se em infeções crónicas. A persistência do papilomavírus nos tecidos é favorecida por várias características particulares desta infecção: o HPV não promove lise celular e consequentemente uma resposta inflamatória; o epitélio infetado por este vírus é desprovido de células apresentadoras de antígeno e a infecção por HPV é pouco indutora da resposta humoral, gerando baixos títulos de anticorpos e anticorpos com pouco poder neutralizante.

Estima-se que a infecção por HPV dure entre os 8 e os 10 meses, com resolução espontânea após este período ou com persistência da infecção. Caso exista resolução da infecção, poderá existir algum grau de memória imunológica, habitualmente exclusiva para o genótipo viral em questão. Quanto maior o período de persistência da infecção maior será a probabilidade de progressão neoplásica, em particular em idades mais avançadas. Em média, irá ocorrer um intervalo de cerca de 10 anos entre a inoculação do HPV e a neoplasia invasiva.

A disparidade entre a prevalência de infecção por HPV e a incidência de lesões por este vírus demonstra que a infecção por HPV, sendo fator necessário, não é fator suficiente para originar uma lesão. Existem fatores ambientais e fatores do hospedeiro que modulam a patogenicidade do HPV, destacando-se o papel da imunidade. A imunidade do hospedeiro, em particular ao nível dos genes do complexo *major* de histocompatibilidade da classe II, tem um papel fulcral na progressão da infecção.

## **Manifestações clínicas**

A infecção por HPV pode manifestar-se de forma clínica, subclínica e latente.

A forma clínica implica infecção visível e, em alguns casos, palpável, como no caso dos condilomas. É a forma mais frequente nos homens. A forma subclínica não tem lesões visíveis a olho nu, mas que podem ser observadas por colposcopia, por exemplo. A forma latente implica ausência de evidência clínica ou citológica. Compreende-se então que progredindo para o nível microscópico, a dependência de métodos de apoio aumenta e a probabilidade de passar despercebida também.

As formas clínicas estão normalmente associadas a HPV de baixo risco, em particular aos tipos 6 e 11, e resumem-se mais frequentemente a condilomas ou a verrugas. Estas lesões são frequentemente reversíveis.

As formas subclínicas são detetadas por colposcopia ou métodos citológicos ou histológicos e estão mais frequentemente associadas a atipias celulares e consequentemente a lesões malignas.

## **Diagnóstico**

Os métodos de sequenciação por PCR são o *Gold Standard* para detetar a presença de HPV em lesões sugestivas. Esta técnica tem-se tornado mais acessível, permitindo estender o rastreio da infecção por HPV a uma maior população mais facilmente.

O método clássico de diagnóstico recorre à hibridação de ácidos nucleicos e amplificação do seu sinal, no entanto, existem alternativas, como o recurso a *microarrays* e a fluorescência para deteção de vários genótipos de HPV em simultâneo. Através de técnicas de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR), é possível quantificar o ARNm correspondente às proteínas E6 e E7, permitindo deduzir a atividade viral com base na quantidade de ARNm.

## **Prevenção**

A prevenção de infecção por HPV centra-se na imunização por vacina. A sua componente imunogénica corresponde à proteína viral L1, sendo que diferentes vacinas irão ter na sua composição proteínas L1 de diferentes genótipos. Estas

proteínas virais irão simular a presença de HPV e estimular a produção de anticorpos neutralizantes contra este vírus.

Atualmente existem duas vacinas contra a infecção por HPV: a vacina bivalente que protege contra os genótipos 16 e 18 e que têm como adjuvantes o hidróxido de alumínio e o monofosforilo lípido A; e a vacina quadrivalente, que incorpora proteínas dos genótipos 6, 11, 16 e 18, tendo como adjuvante o sulfato de hidroxifosfato de alumínio amorfo.

Evidência atual sugere que estas vacinas possam conferir imunidade cruzada para os HPV tipo 31, 33, 35, 39, 45, 52, 58 e 59. Apesar disso, existem esforços para a criação de vacinas de 2ª geração que ao invés de se basearem na proteína L1, irão ter como base a região terminal-N da proteína L2, podendo abranger mais genótipos de HPV.

## HPV na Carcinogénese do Pulmão

### Relevância

O envolvimento dos vírus na génese de diversos tipos de cancro do pulmão tem suscitado interesse desde há relativamente pouco tempo. A hipótese de que o HPV participe na origem destas lesões surge em 1979 quando Syrjanene descreve uma lesão condilomatosa, em tudo sugestiva de infeção por HPV, no epitélio brônquico.<sup>53</sup>

A extensão desta associação é difícil de determinar uma vez que os dados relativos ao impacto deste vírus no pulmão são inconsistentes. Vários estudos alegam que o HPV não tem papel no desenvolvimento de cancro do pulmão, enquanto outros encontraram uma prevalência baixa a moderada ou até extremamente alta. A possível relação parece estar mais associada a populações específicas, como os não fumadores e mulheres asiáticas.<sup>54, 55, 56, 57</sup>

### Variabilidade de dados

A diversidade de resultados na evidência relativa ao papel do HPV no cancro do pulmão é um dos desafios no estudo deste tema. Esta variabilidade pode ser explicada por vários fatores, seja a área geográfica estudada, o tipo de cancro, a amostra biológica (biópsia pulmonar a fresco ou congelada, tecido em parafina, condensado de ar exalado) ou o método de análise (PCR, técnicas de *southern blot*, hibridação *in situ*...).

As diferenças regionais significativas na prevalência de HPV em tecido neoplásico pulmonar podem refletir a variabilidade da prevalência da própria infeção por HPV: a prevalência do HPV varia entre 0.0 a 78.3%, com variações significativas com base na geografia ou no tecido histológico;<sup>58</sup> estas diferenças são congruentes com a prevalência de HPV no cancro do pulmão, que é superior na Ásia (16.6%) e inferior na Europa (7.0%).<sup>48</sup> Estes dados poderão ter peso em futuras estratégias de prevenção, personalizadas para cada região geográfica.

Relativamente à influência do sexo, os resultados são dissonantes, com alguns estudos a reportar um prevalência do HPV no cancro do pulmão semelhante em ambos os sexos,<sup>59</sup> e outros com resultados contrários<sup>60</sup>. Poderá ser pertinente esclarecer esta

relação em amostras maiores e mais diversas, uma vez que é possível que existam diferenças na fisiopatologia do HPV com base no sexo do hospedeiro.

A prevalência do HPV no cancro do pulmão pode variar com base na histologia tumoral, sendo que o carcinoma pavimentoso foi o mais frequentemente associado à infecção viral. Note-se que esta diferença poderá estar enviesada por características populacionais, uma vez que os carcinomas pavimentosos são mais frequentes na Ásia e a distinção na prevalência com base na histologia não foi reportada em estudos europeus ou americanos.<sup>48</sup>

Outra dificuldade deve-se apenas à elevada prevalência do HPV. A ubiquidade deste vírus torna difícil apresentar conclusões demográficas, uma vez que células infetadas *bystander* poderão originar resultados positivos por PCR, mesmo não estando necessariamente implicadas no processo oncológico.<sup>47</sup>

### **Deteção**

A infecção por HPV em doentes com cancro do pulmão já foi explorada antes, recorrendo a lavado broncoalveolar, a tecido a fresco ou a tecido tratado com parafina. Todas estas amostras são obtidas por técnicas invasivas, pelo que poderão ser postas em segundo plano quando apenas dirigidas à investigação científica.

Em virtude desta dificuldade, a análise do condensado de ar exalado tem-se tornado popular em estudos relativos às neoplasias do pulmão. Esta estratégia já foi testada para a infecção por HPV, tendo-se provado eficaz.<sup>59</sup>

### **Fisiopatologia**

Caso se verifique que o vírus do papiloma humano tem de facto um papel no desenvolvimento do cancro do pulmão, os mecanismos pelos quais promove a carcinogénese permanecem, na sua grande maioria, por conhecer.

#### *Transmissão*

O HPV é tipicamente transmitido por contacto direto entre mucosas ou epitélios infetados,<sup>61</sup> no entanto este meio de transmissão não é possível no pulmão. Deste modo, o mecanismo pelo qual o papilomavírus infeta o pulmão permanece incerto. Tem sido sugerido que este vírus possa ser transmitido a partir do trato aerodigestivo,<sup>62</sup>

ou a partir do trato genital.<sup>53</sup> A via hematogénea pode também ser uma via de transmissão através do recurso aos linfócitos periféricos, sendo uma hipótese suportada pela associação encontrada entre ADN do HPV 16 em circulação e em tecido neoplásico do pulmão.<sup>63</sup> Existe ainda evidência concordante com transmissão por via inalatória, seja por fumos cirúrgicos com DNA viral associados à terapia laser de lesões ginecológicas,<sup>64</sup> ou pela exalação de partículas por indivíduos com neoplasia do pulmão.<sup>59</sup>

Ressalva-se que uma eventual transmissão de HPV no cancro do pulmão seria facilitada pelo facto de células neoplásicas terem maior probabilidade de integrar o material genético viral no genoma tumoral.<sup>65</sup>

### *Integração*

Os genótipos oncogénicos do HPV parecem ser detetados com mais frequência em tecido neoplásico do pulmão. À semelhança de outros cancros relacionados com a infeção por HPV, os tipos 16 e 18 parecem ser os mais associados à malignidade no pulmão. De facto, o tipo 16 é reportado cerca de duas vezes mais que o genótipo 18, sendo este um dos achados mais consistentes no estudo da associação HPV-cancro do pulmão.<sup>48</sup>

Mantém-se por esclarecer se a integração do genoma viral nas células neoplásicas ocorre antes ou depois da expansão clonal. Por um lado, se a infeção por HPV for o evento primário, seria de esperar que o ADN viral estivesse presente em todas as células cancerígenas. No entanto, a evidência relativa a esta questão reporta que a infeção por HPV está presente apenas numa pequena proporção das células neoplásicas.<sup>66</sup> Este achado sugere que o HPV não seria um fator causal, mas sim um fator contribuidor para a carcinogénese do pulmão. Não obstante, o mecanismo de *hit and run* seria simultaneamente concordante com uma relação de causalidade e com os achados acima descritos. Ou seja, caso o ADN viral seja gradualmente perdido na transformação neoplásica, como já foi sugerido em outros estudos relativos ao HPV, seria de esperar uma baixa carga viral.<sup>67</sup>

Pensa-se que os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) sejam o local inicial de ligação para a cápside do papilomavírus. Estas moléculas são expressadas na matriz

celular da maioria das células, sendo que no pulmão estão presentes na membrana basal de células epiteliais alveolares do tipo I. Ademais, recentemente mostrou-se que o HPV se liga preferencialmente a células neoplásicas do pulmão, *in vitro* e *in vivo*.<sup>68, 69</sup>

#### *Interferências no ciclo celular e funções supressoras de tumor*

A principal influência oncogénica do HPV é a sua interferência no ciclo celular e nas funções supressoras de tumor das células. Relativamente ao CPNPC, os possíveis mecanismos base destas interferências são diversos, sendo explicitados sucintamente em seguida.

#### P53

A proteína p53 induz a interrupção do ciclo celular ou apoptose na presença de danos consideráveis no ADN celular.<sup>70</sup> A proteína viral E6 promove a degradação da p53, ligando-se à ubiquitina-ligase E6AP.<sup>71</sup> Adicionalmente, no cancro do pulmão, foi compreendido que a proteína E6 inibe a transcrição da p21(WAF1/CIP1) e da mdm-2, dois alvos a jusante da p53 na via da apoptose.<sup>70</sup>

#### pRb

A oncoproteína E7 induz a degradação da proteína supressora do retinoblastoma (pRb), contribuindo para a dissociação do complexo E2F/pRb/deacetilase das histonas (HDAC). Por sua vez, a dissociação do complexo HDAC promove a hipermetilação da proteína p16(INK4), uma proteína supressora de tumor.<sup>72, 73</sup> A prevalência da hipermetilação desta proteína foi superior nos casos de mulheres não fumadoras com CPNPC infetadas por HPV quando comparadas com um grupo controlo não infetado por este vírus.<sup>73</sup>

#### FHIT

A deleção do alelo do gene supressor de tumor *Fragile Histidine Triad Diadenosine Triphosphatase* (FHIT) é uma etapa importante no desenvolvimento do cancro do pulmão e pode ser interpretada como marcador de mau prognóstico.<sup>48, 74</sup>

A perda de heterozigotia do alelo FHIT foi observada em frequência significativa em mulheres com cancro do pulmão, não fumadoras infetadas por HPV, sugerindo a interferência deste vírus na carcinogénese por esta via. Acredita-se que a deleção do alelo FHIT e a mutação da p53 promovidas pela infeção pelo HPV possam ter um efeito sinérgico no desenvolvimento de cancro do pulmão.<sup>54, 75</sup>

## EGFR

A mutação do gene *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) foi associada à presença do HPV no CPNPC. Em indivíduos HPV-positivos, a mutação somática do EGFR era significativamente mais frequente quando em comparação com indivíduos HPV-negativos. É de destacar que se observou aumento da sobrevida e da resposta a TKI do EGFR em doentes com CPNPC e infecção por HPV.<sup>76,77</sup>

## Moduladores da Angiogénese

O Fator Indutível pela Hipóxia 1 (HIF-1) é um fator de transcrição envolvido na modulação da angiogénese, sendo crucial para o crescimento tumoral, a metastização e a resistência farmacológica.<sup>78</sup>

Os casos de CPNPC associados a infecção por HPV aparentam ter uma maior expressão de HIF-1 que CPNPC HPV-negativos.<sup>70,79</sup>

## Fatores da Transição epitélio-mesênquima (EMT)

As proteínas E6 e E7 do HPV 16 afetam fatores de transcrição como ZEB1, Snail1, Slug e Twist1, contribuindo para o desenvolvimento de CPNPC.<sup>80</sup>

## Outros

Nos adenocarcinomas do pulmão, a proteína E6 do HPV-16 estimula a libertação de interleucina-8, aumentando a expressão de metalopeptidases da matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), proteínas da família das metaloproteinases e responsáveis pela degradação da matriz.<sup>81</sup>

A perda de heterozigotia do Inibidor Tecidual de Metaloproteínas 3 (TIMP-3) foi associada a diversos cancros, incluindo o CPNPC. Esta supressão leva ao aumento da síntese de interleucina-6, promovendo comportamento neoplásico e pior prognóstico em CPNPC com infecção por HPV.<sup>82,83</sup>

A transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) está implicada na imortalidade e transformação neoplásica de células humanas. No cancro do pulmão associado ao HPV, a proteína E6 aparenta promover a sobreexpressão de hTERT, em particular no CPNPC.<sup>84,85</sup>

A proteína de diferenciação celular de leucemia mielóide induzida (Mcl-1) é uma proteína anti-apoptótica da família Bcl-2. A presença de ADN do papilomavírus foi associada a uma maior expressão de interleucina-6, interleucina-17 e Mcl-1 no CPNPC. Estes achados sugerem que a carcinogénese do pulmão associada ao HPV é

induzida por um microambiente inflamatório criado em resposta aos próprios estímulos do papilomavírus.<sup>86, 87</sup>

Um aumento da expressão da proteína *Foxhead box M1* (FOXM1) está ligado ao desenvolvimento tumoral e mau prognóstico em diversos cancros, incluindo no CPNPC. A proteína E6 foi associada a um aumento da expressão da FOXM1, potenciando invasão celular em CPNPC HPV-positivos.<sup>88, 89</sup>

## **Tabagismo**

Uma possível co-responsabilidade do tabagismo e da infeção por HPV na carcinogénese foi investigada, no entanto, nenhuma associação significativa foi consolidada, sugerindo que a infeção por HPV possa ser um fator independente no desenvolvimento de cancro do pulmão.<sup>14</sup>

Não obstante, observou-se que as neoplasias em fumadores tinham maior prevalência de infeção por HPV que em não fumadores. Este facto pode ser explicado pelas micro-abrasões provocadas pelo tabaco no epitélio respiratório, fator fundamental à invasão pelo HPV das camadas basais das mucosas.<sup>16</sup>

Adicionalmente, quando expostas ao fumo do tabaco, células neoplásicas pulmonares infetadas por HPV 16 multiplicaram-se consideravelmente.<sup>90</sup>

O benzopireno, um componente frequente no fumo do tabaco, aumenta a presença do genoma do HPV, sugerindo uma interação entre ambos no CPNPC. Este agente leva à hipermetilação de genes promotores, inativando a reparação do genoma.<sup>91, 92</sup>

## **Prognóstico**

Desconhece-se o impacto da infeção por HPV no prognóstico do cancro do pulmão. Os estudos que procuram resposta a esta questão apresentam resultados díspares, com alguns autores a reportar bom valor prognóstico e outros a declarar que não existe associação.<sup>1</sup>

Foi hipotetizado que a presença do HPV possa atrair células imunitárias para o microambiente tumoral, resultando num melhor prognóstico.<sup>70</sup> A infeção natural por HPV não parece ser muito indutora de uma resposta imunogénica, o que contraria esta hipótese, no entanto, um ambiente tumoral está frequentemente associado a lise

celular e extravasamento de conteúdo, tornando mais provável o reconhecimento das partículas virais.

### **Perspetivas futuras**

A variabilidade no desenho dos estudos, nos métodos utilizados e nas particularidades biológicas intrínsecas das populações contribui para grande disparidade de resultados, tornando difícil alcançar conclusões sólidas. Não obstante, as implicações de uma correlação positiva entre a infeção por HPV e a carcinogénese do pulmão em termos de prevenção, tratamento e prognóstico poderão ser demasiado significativas para ignorar.

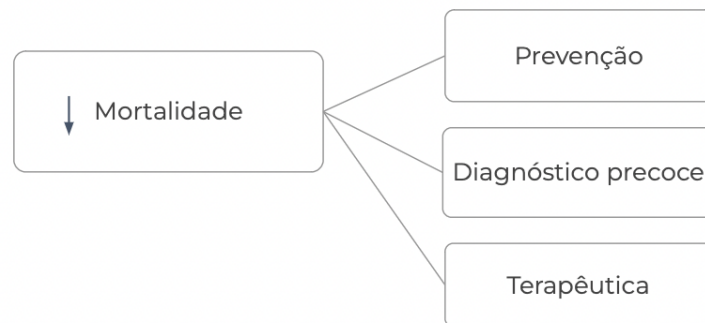


Figura 3 - Esquema relativo às áreas de ação para redução da mortalidade do cancro do pulmão.

## Conclusão

O cancro do pulmão mantém-se uma das principais causas de morte no mundo. Apesar de ser conhecido o efeito predominante do tabaco na sua incidência, verifica-se atualmente, nos países industrializados, uma tendência de cinética descendente para a incidência do tabagismo e de cinética ascendente para a incidência de cancro em não fumadores. Torna-se assim fulcral observar outros fatores envolvidos na carcinogénese.

O Vírus do Papiloma Humano é um conhecido carcinogénio. A compreensão da sua fisiopatologia e envolvimento na história natural dos cancros do trato genital modificou completamente a abordagem de prevenção e terapêutica destas neoplasias. A sugestão do envolvimento do HPV em alguns cancros do pulmão não é recente, mas a evolução epidemiológica da sua incidência gerou uma nova onda de interesse nesta possível associação.

A variabilidade nos resultados relativos a esta temática impele a uma standardização dos métodos usados e de uma consideração séria dos impactos geográficos na biologia das populações. Apesar da dificuldade suscitada por estas divergências, a pesquisa e o esclarecimento de uma possível associação entre o papilomavírus e o cancro do pulmão mantém-se pertinente. Uma associação positiva prevê impacto terapêutico e prognóstico, além de uma renovação da relevância da vacina contra a infeção por HPV, podendo justificar uma modificação dos planos vacinais aplicados até à data. A necessidade de novos biomarcadores prognósticos no cancro do pulmão também é uma necessidade clínica que se mantém por satisfazer.

Em suma, o estudo do impacto da infeção por HPV na carcinogénese no pulmão é uma hipótese de peso a rever e avaliar, pelo impacto clínico de uma associação positiva. No entanto, propõe-se que se conciliem esforços nas diferentes áreas do globo para não só harmonizar os métodos utilizados como para concluir o verdadeiro impacto da geografia nesta associação.

## Referências

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
2. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *70*(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
3. Jemal, A., Center, M. M., DeSantis, C., & Ward, E. M. (2010). Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *19*(8), 1893–1907. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-10-0437>
4. Wakelee, H. A., Chang, E. T., Gomez, S. L., Keegan, T. H., Feskanich, D., Clarke, C. A., Holmberg, L., Yong, L. C., Kolonel, L. N., Gould, M. K., & West, D. W. (2007). Lung Cancer Incidence in Never Smokers. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(5), 472–478. <https://doi.org/10.1200/jco.2006.07.2983>
5. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(2), 74–108. <https://doi.org/10.3322/canjclin.55.2.74>
6. Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., & Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, *398*(10299), 535–554. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00312-3)
7. Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A., & Nicholson, A.G. (2015) WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
8. Wiener, C., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, L. J., Kasper, D., & Loscalzo, J. (2021). *Harrison's Principles of Internal Medicine Self-Assessment and Board Review, 20th Edition* (20th ed.). McGraw Hill / Medical.
9. Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020. *Clinics in Chest Medicine*, *41*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>

10. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
11. Chevallier, M., Borgeaud, M., Addeo, A., & Friedlaender, A. (2021). Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future. *World Journal of Clinical Oncology*, *12*(4), 217–237. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i4.217>
12. Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Beasley, M. B., Chitale, D. A., Dacic, S., Giaccone, G., Jenkins, R. B., Kwiatkowski, D. J., Saldivar, J. S., Squire, J., Thunnissen, E., & Ladanyi, M. (2013). Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *137*(6), 828–860. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0720-oa>
13. Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F., & Buttitta, F. (2011). Clinical Features and Outcome of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(26), 3574–3579. <https://doi.org/10.1200/jco.2011.35.9638>
14. Walters, S., Maringe, C., Coleman, M. P., Peake, M. D., Butler, J., Young, N., Bergström, S., Hanna, L., Jakobsen, E., Kölbl, K., Sundstrøm, S., Engholm, G., Gavin, A., Gjerstorff, M. L., Hatcher, J., Johannesen, T. B., Linklater, K. M., McGahan, C. E., Steward, J., . . . Rachet, B. (2013). Lung cancer survival and stage at diagnosis in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden and the UK: a population-based study, 2004–2007. *Thorax*, *68*(6), 551–564.  
<https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-202297>
15. Humphrey, L. L., Teutsch, S., & Johnson, M. (2004). Lung Cancer Screening with Sputum Cytologic Examination, Chest Radiography, and Computed Tomography: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine*, *140*(9), 740.  
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-9-200405040-00015>

16. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. (2011). *New England Journal of Medicine*, 365(5), 395–409. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1102873>
17. Han, S. S., Chow, E., ten Haaf, K., Toumazis, I., Cao, P., Bastani, M., Tammemagi, M., Jeon, J., Feuer, E. J., Meza, R., & Plevritis, S. K. (2020). Disparities of National Lung Cancer Screening Guidelines in the US Population. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 112(11), 1136–1142. <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa013>
18. de Koning, H. J., van der Aalst, C. M., de Jong, P. A., Scholten, E. T., Nackaerts, K., Heuvelmans, M. A., Lammers, J. W. J., Weenink, C., Yousaf-Khan, U., Horeweg, N., van 't Westeinde, S., Prokop, M., Mali, W. P., Mohamed Hoesein, F. A., van Ooijen, P. M., Aerts, J. G., den Bakker, M. A., Thunnissen, E., Verschakelen, J., . . . Oudkerk, M. (2020). Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *New England Journal of Medicine*, 382(6), 503–513. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1911793>
19. Howlader, N., Forjaz, G., Mooradian, M. J., Meza, R., Kong, C. Y., Cronin, K. A., Mariotto, A. B., Lowy, D. R., & Feuer, E. J. (2020). The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *New England Journal of Medicine*, 383(7), 640–649. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1916623>
20. Ning, J., Ge, T., Jiang, M., Jia, K., Wang, L., Li, W., Chen, B., Liu, Y., Wang, H., Zhao, S., & He, Y. (2021). Early diagnosis of lung cancer: which is the optimal choice? *Aging*, 13(4), 6214–6227. <https://doi.org/10.18632/aging.202504>
21. Tan, D. S., Camilleri-Broët, S., Tan, E. H., Alifano, M., Lim, W. T., Bobbio, A., Zhang, S., Ng, Q. S., Ang, M. K., Iyer, N. G., Takano, A., Lim, K. H., Régnard, J. F., Tan, P., & Broët, P. (2014b). Intertumor heterogeneity of non-small-cell lung carcinomas revealed by multiplexed mutation profiling and integrative genomics. *International Journal of Cancer*, 135(5), 1092–1100. <https://doi.org/10.1002/ijc.28750>
22. Dejea, C. M., Fathi, P., Craig, J. M., Boleij, A., Taddese, R., Geis, A. L., Wu, X., DeStefano Shields, C. E., Hechenbleikner, E. M., Huso, D. L., Anders, R. A., Giardiello, F. M., Wick, E. C., Wang, H.,

- Wu, S., Pardoll, D. M., Housseau, F., & Sears, C. L. (2018b). Patients with familial adenomatous polyposis harbor colonic biofilms containing tumorigenic bacteria. *Science*, *359*(6375), 592–597. <https://doi.org/10.1126/science.aah3648>
23. Dzutsev, A., & Trinchieri, G. (2020b). Microbial DNA signature in plasma enables cancer diagnosis. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *17*(8), 453–454. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0391-1>
24. Situ, D., Long, H., Tan, Q., Luo, Q., Wang, Z., Jiang, G., & Rong, T. (2019). OA13.02 Video-Assisted Thoracoscopic Surgery vs. Thoracotomy for Non-Small Cell Lung Cancer: Survival Outcome of a Randomized Trial. *Journal of Thoracic Oncology*, *14*(10), S240. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.478>
25. Vyse, S., & Huang, P. H. (2019). Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *4*(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0038-9>
26. Soria, J. C., Ohe, Y., Vansteenkiste, J., Reungwetwattana, T., Chewaskulyong, B., Lee, K. H., Dechaphunkul, A., Imamura, F., Nogami, N., Kurata, T., Okamoto, I., Zhou, C., Cho, B. C., Cheng, Y., Cho, E. K., Voon, P. J., Planchard, D., Su, W. C., Gray, J. E., . . . Ramalingam, S. S. (2018). Osimertinib in Untreated EGFR-Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *378*(2), 113–125. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1713137>
27. Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S. I., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y., & Mano, H. (2007). Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, *448*(7153), 561–566. <https://doi.org/10.1038/nature05945>
28. Selvaggi, G., Wakelee, H., Mok, T., Wu, Y. L., Reck, M., Chiappori, A., Cicin, I., Lee, D., Breder, V., Fan, Y., Orlov, S., Poddubskaya, E., Wang, Z., Cheng, Y., Liu, Y., Wu, G., Mao, L., Zhou, J., Oertel, V., . . . Liang, C. (2020). ID:1882 Phase III Randomized Study of Ensartinib vs Crizotinib in

- Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) POSITIVE NSCLC Patients: eXalt3. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(10), e41–e42. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.08.003>
29. Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M. J., Felip, E., Lee, J. S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J. C., Dolled-Filhart, M., . . . Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21), 2018–2028. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1501824>
30. Alberg, A. J., & Samet, J. M. (2003). Epidemiology of Lung Cancer\*. *Chest*, 123(1), 21S-49S. [https://doi.org/10.1378/chest.123.1\\_suppl.21s](https://doi.org/10.1378/chest.123.1_suppl.21s)
31. Plummer, M., de Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health*, 4(9), e609–e616. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(16\)30143-7](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(16)30143-7)
32. Wong, S. H., & Yu, J. (2019). Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16(11), 690–704. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0209-8>
33. Whiteside, S. A., McGinniss, J. E., & Collman, R. G. (2021). The lung microbiome: progress and promise. *Journal of Clinical Investigation*, 131(15). <https://doi.org/10.1172/jci150473>
34. Carney, S. M., Clemente, J. C., Cox, M. J., Dickson, R. P., Huang, Y. J., Kitsios, G. D., Kloepfer, K. M., Leung, J. M., LeVan, T. D., Molyneaux, P. L., Moore, B. B., O’Dwyer, D. N., Segal, L. N., & Garantziotis, S. (2020). Methods in Lung Microbiome Research. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 62(3), 283–299. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2019-0273tr>
35. Charlson, E. S., Bittinger, K., Haas, A. R., Fitzgerald, A. S., Frank, I., Yadav, A., Bushman, F. D., & Collman, R. G. (2011). Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(8), 957–963. <https://doi.org/10.1164/rccm.201104-0655oc>

36. Gleeson, K., Maxwell, S. L., & Eggli, D. F. (1997). Quantitative Aspiration During Sleep in Normal Subjects. *Chest*, *111*(5), 1266–1272. <https://doi.org/10.1378/chest.111.5.1266>
37. Dickson, R. P., Erb-Downward, J. R., Falkowski, N. R., Hunter, E. M., Ashley, S. L., & Huffnagle, G. B. (2018). The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *198*(4), 497–508. <https://doi.org/10.1164/rccm.201711-2180oc>
38. Cameron, S. J. S., Lewis, K. E., Huws, S. A., Hegarty, M. J., Lewis, P. D., Pachebat, J. A., & Mur, L. A. J. (2017). A pilot study using metagenomic sequencing of the sputum microbiome suggests potential bacterial biomarkers for lung cancer. *PLOS ONE*, *12*(5), e0177062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177062>
39. Peters, B. A., Hayes, R. B., Goparaju, C., Reid, C., Pass, H. I., & Ahn, J. (2019). The Microbiome in Lung Cancer Tissue and Recurrence-Free Survival. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, *28*(4), 731–740. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-18-0966>
40. Tsay, J. C. J., Wu, B. G., Sulaiman, I., Gershner, K., Schluger, R., Li, Y., Yie, T. A., Meyn, P., Olsen, E., Perez, L., Franca, B., Carpenito, J., Iizumi, T., El-Ashmawy, M., Badri, M., Morton, J. T., Shen, N., He, L., Michaud, G., . . . Segal, L. N. (2020). Lower Airway Dysbiosis Affects Lung Cancer Progression. *Cancer Discovery*, *11*(2), 293–307. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-20-0263>
41. Greathouse, K. L., White, J. R., Vargas, A. J., Bliskovsky, V. V., Beck, J. A., von Muhlinen, N., Polley, E. C., Bowman, E. D., Khan, M. A., Robles, A. I., Cooks, T., Ryan, B. M., Padgett, N., Dzutsev, A. H., Trinchieri, G., Pineda, M. A., Bilke, S., Meltzer, P. S., Hokenstad, A. N., . . . Harris, C. C. (2018). Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. *Genome Biology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1501-6>
42. Khan, S., Imran, A., Khan, A. A., Abul Kalam, M., & Alshamsan, A. (2016). Systems Biology Approaches for the Prediction of Possible Role of Chlamydia pneumoniae Proteins in the Etiology of Lung Cancer. *PLOS ONE*, *11*(2), e0148530. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148530>

43. Yu, Y. H., Liao, C. C., Hsu, W. H., Chen, H. J., Liao, W. C., Muo, C. H., Sung, F. C., & Chen, C. Y. (2011). Increased Lung Cancer Risk among Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Population Cohort Study. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(1), 32–37. <https://doi.org/10.1097/jto.0b013e3181fb4fcc>
44. Young, J. C., Chehoud, C., Bittinger, K., Bailey, A., Diamond, J. M., Cantu, E., Haas, A. R., Abbas, A., Frye, L., Christie, J. D., Bushman, F. D., & Collman, R. G. (2014). Viral Metagenomics Reveal Blooms of Anelloviruses in the Respiratory Tract of Lung Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 15(1), 200–209. <https://doi.org/10.1111/ajt.13031>
45. Abbas, A. A., Taylor, L. J., Dothard, M. I., Leiby, J. S., Fitzgerald, A. S., Khatib, L. A., Collman, R. G., & Bushman, F. D. (2019). Redondoviridae, a Family of Small, Circular DNA Viruses of the Human Oro-Respiratory Tract Associated with Periodontitis and Critical Illness. *Cell Host & Microbe*, 25(5), 719–729.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.04.001>
46. Lim, Y. W., Schmieder, R., Haynes, M., Willner, D., Furlan, M., Youle, M., Abbott, K., Edwards, R., Evangelista, J., Conrad, D., & Rohwer, F. (2013). Metagenomics and metatranscriptomics: Windows on CF-associated viral and microbial communities. *Journal of Cystic Fibrosis*, 12(2), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2012.07.009>
47. Brouchet, L., Valmary, S., Dahan, M., Didier, A., Galateau-Salle, F., Brousset, P., & Degano, B. (2005). Detection of oncogenic virus genomes and gene products in lung carcinoma. *British Journal of Cancer*, 92(4), 743–746. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602409>
48. Karnosky, J., Dietmaier, W., Knuettel, H., Freigang, V., Koch, M., Koll, F., Zeman, F., & Schulz, C. (2021). HPV and lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Reports*, 4(4). <https://doi.org/10.1002/cnr2.1350>
49. Syrjanen, K. J. (2002). HPV infections and lung cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 55(12), 885–891. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.12.885>

50. Grinstein, S., Preciado, M.V., Gattuso, P., Chabay, P.A., Warren, W.H., De Matteo, E. & Gould, V.E. (2002) Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Research* 62: 4876–4878
51. Galateau-Salle, F., Bidet, P., Iwatsubo, Y., Gennetay, E., Renier, A., Letourneux, M., Pairon, J.C., Moritz, S., Brochard, P., Jaurand, M.C. & Freymuth F (1998) Detection of SV40-like DNA sequences in pleural mesothelioma, bronchopulmonary carcinoma and other pulmonary diseases. *Developments in Biology Standardization* 94: 147–152
52. Cao, S., Wendl, M. C., Wyczalkowski, M. A., Wylie, K., Ye, K., Jayasinghe, R., Xie, M., Wu, S., Niu, B., Grubb, R., Johnson, K. J., Gay, H., Chen, K., Rader, J. S., Dipersio, J. F., Chen, F., & Ding, L. (2016). Divergent viral presentation among human tumors and adjacent normal tissues. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep28294>
53. Syrjänen, K. J. (1979). Condylomatous Changes in Neoplastic Bronchial Epithelium. *Respiration*, 38(5), 299–304. <https://doi.org/10.1159/000194095>
54. Cheng, Y. W., Chiou, H. L., Sheu, G. T., Hsieh, L. L., Chen, J. T., Chen, C. Y., Su, J. M., & Lee, H. (2001). The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women. *Cancer research*, 61(7), 2799–2803
55. Nadji, S. A., Mokhtari-Azad, T., Mahmoodi, M., Yahyapour, Y., Naghshvar, F., Torabizadeh, J., Ziaee, A. A., & Nategh, R. (2007). Relationship between lung cancer and human papillomavirus in north of Iran, Mazandaran province. *Cancer Letters*, 248(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.05.016>
56. Sarchianaki, E., Deras, S. P., Ntaoukakis, M., Vakonaki, E., Lagoudaki, E. D., Lasithiotaki, I., Sarchianaki, A., Koutsopoulos, A., Symvoulakis, E. K., Spandidos, D. A., Antoniou, K. M., & Sourvinos, G. (2013). Detection and genotype analysis of human papillomavirus in non-small cell lung cancer patients. *Tumor Biology*, 35(4), 3203–3209. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1419-2>

57. Anantharaman, D., Gheit, T., Waterboer, T., Halec, G., Carreira, C., Abedi-Ardekani, B., McKay-Chopin, S., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Mates, D., Janout, V., Foretova, L., Bencko, V., Rudnai, P., Fabianova, E., Tjønneland, A., Travis, R. C., . . . Brennan, P. (2014). No Causal Association Identified for Human Papillomavirus Infections in Lung Cancer. *Cancer Research*, *74*(13), 3525–3534. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-13-3548>
58. Srinivasan, M., Taioli, E., & C.Ragin, C. (2009). Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers--a meta-analysis. *Carcinogenesis*, *30*(10), 1722–1728. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp177>
59. Carpagnano, G. E., Koutelou, A., Natalicchio, M. I., Martinelli, D., Ruggieri, C., di Taranto, A., Antonetti, R., Carpagnano, F., & Foschino-Barbaro, M. P. (2011). HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. *British Journal of Cancer*, *105*(8), 1183–1190. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.354>
60. Cheng, Y. W., Chiou, H. L., Chen, J. T., Chou, M. C., Lin, T. S., Lai, W. W., Chen, C. Y., Tsai, Y. Y., & Lee, H. (2004). Gender difference in human papillomavirus infection for non-small cell lung cancer in Taiwan. *Lung Cancer*, *46*(2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.03.023>
61. Kashima, H., Leventhal, B., Mounts, P., & Hruban, R. H. (1993). Sites of Predilection in Recurrent Respiratory Papillomatosis. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, *102*(8), 580–583. <https://doi.org/10.1177/000348949310200802>
62. Gillison, M. L., & Shah, K. V. (2003). Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*, (31), 57–65. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003484>
63. Chiou, H. L., Wu, M. F., Liaw, Y. C., Cheng, Y. W., Wong, R. H., Chen, C. Y., & 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. <https://doi.org/10.1002/cncr.11191>

64. Zhou, Q., Hu, X., Zhou, J., Zhao, M., Zhu, X., & Zhu, X. (2019). Human papillomavirus DNA in surgical smoke during cervical loop electrosurgical excision procedures and its impact on the surgeon. *Cancer Management and Research, Volume 11*, 3643–3654. <https://doi.org/10.2147/cmar.s201975>
65. Klein, F., Amin Kotb, W. F., & Petersen, I. (2009). Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer, 65*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2008.10.003>
66. Aguayo, F., Castillo, A., Koriyama, C., Higashi, M., Itoh, T., Capetillo, M., Shuyama, K., Corvalan, A., Eizuru, Y., & Akiba, S. (2007). Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *British Journal of Cancer, 97*(1), 85–91. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603848>
67. Aubin, F., Humbey, O., Guérrini, J. S., Mougin, C., & Laurent, R. (2003). Cancers cutanés non mélaniques et papillomavirus humains [Non-melanoma skin cancers and human papillomavirus]. *Annales de dermatologie et de venerologie, 130*(12 Pt 1), 1131–1138.
68. Smits, N. C., Shworak, N. W., Dekhuijzen, P. R., & van Kuppevelt, T. H. (2010). Heparan Sulfates in the Lung: Structure, Diversity, and Role in Pulmonary Emphysema. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 293*(6), 955–967. <https://doi.org/10.1002/ar.20895>
69. Kines, R. C., Cerio, R. J., Roberts, J. N., Thompson, C. D., de Los Pinos, E., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (2015). Human papillomavirus capsids preferentially bind and infect tumor cells. *International Journal of Cancer, 138*(4), 901–911. <https://doi.org/10.1002/ijc.29823>
70. Hu, Y., Ren, S., He, Y., Wang, L., Chen, C., Tang, J., Liu, W., & Yu, F. (2020). Possible Oncogenic Viruses Associated with Lung Cancer. *OncoTargets and Therapy, Volume 13*, 10651–10666. <https://doi.org/10.2147/ott.s263976>
71. Martinez-Zapien, D., Ruiz, F. X., Poirson, J., Mitschler, A., Ramirez, J., Forster, A., Cousido-Siah, A., Masson, M., Pol, S. V., Podjarny, A., Travé, G., & Zanier, K. (2016). Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature, 529*(7587), 541–545. <https://doi.org/10.1038/nature16481>

72. Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103–112. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00102-2)
73. Wu, M. F., Cheng, Y. W., Lai, J. C., Hsu, M. C., Chen, J. T., Liu, W. S., Chiou, M. C., Chen, C. Y., & Lee, H. (2004). Frequent p16INK4a promoter hypermethylation in human papillomavirus-infected female lung cancer in Taiwan. *International Journal of Cancer*, 113(3), 440–445. <https://doi.org/10.1002/ijc.20597>
74. Burke, L., Khan, M. A., Freedman, A. N., Gemma, A., Rusin, M., Guinee, D. G., Bennett, W. P., Caporaso, N. E., Fleming, M. V., Travis, W. D., Colby, T. V., Trastek, V., Pairolero, P. C., Tazelaar, H. D., Midthun, D. E., Liotta, L. A., & Harris, C. C. (1998). Allelic deletion analysis of the FHIT gene predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Cancer research*, 58(12), 2533–2536.
75. Yu, Y., Liu, X., Yang, Y., Zhao, X., Xue, J., Zhang, W., & Yang, A. (2015). Effect of FHIT loss and p53 mutation on HPV-infected lung carcinoma development. *Oncology Letters*, 10(1), 392–398. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3213>
76. Liang, H., Pan, Z., Cai, X., Wang, W., Guo, C., He, J., Chen, Y., Liu, Z., Wang, B., He, J., & Liang, W. (2018). The association between human papillomavirus presence and epidermal growth factor receptor mutations in Asian patients with non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 7(3), 397–403. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.03.16>
77. Koriyama. (2010). Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinomas. *Oncology Reports*, 23(4). [https://doi.org/10.3892/or\\_00000736](https://doi.org/10.3892/or_00000736)
78. Jackson, A. L., Zhou, B., & Kim, W. Y. (2010). HIF, hypoxia and the role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14(10), 1047–1057. <https://doi.org/10.1517/14728222.2010.511617>
79. Li, G., He, L., Zhang, E., Shi, J., Zhang, Q., Le, A. D., Zhou, K., & Tang, X. (2011). Overexpression of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins promotes angiogenesis via enhancing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Letters*, 311(2), 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.07.012>

80. Liu, J., Huang, B., Xiu, Z., Zhou, Z., Liu, J., Li, X., & Tang, X. (2018). PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway mediates HPV-16 oncoprotein-induced expression of EMT-related transcription factors in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cancer*, *9*(19), 3456–3466. <https://doi.org/10.7150/jca.26112>
81. Shiau, M. Y., Fan, L. C., Yang, S. C., Tsao, C. H., Lee, H., Cheng, Y. W., Lai, L. C., & Chang, Y. H. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054423>
82. van Boerdonk, R. A., Daniels, J. M., Bloemena, E., Krijgsman, O., Steenbergen, R. D., Brakenhoff, R. H., Grünberg, K., Ylstra, B., Meijer, C. J., Smit, E. F., Snijders, P. J., & Heideman, D. A. (2013). High-Risk Human Papillomavirus–Positive Lung Cancer: Molecular Evidence for a Pattern of Pulmonary Metastasis. *Journal of Thoracic Oncology*, *8*(6), 711–718. <https://doi.org/10.1097/jto.0b013e3182897c14>
83. Wu, D. W., Tsai, L. H., Chen, P. M., Lee, M. C., Wang, L., Chen, C. Y., Cheng, Y. W., & Lee, H. (2012). Loss of TIMP-3 Promotes Tumor Invasion via Elevated IL-6 Production and Predicts Poor Survival and Relapse in HPV-Infected Non–Small Cell Lung Cancer. *The American Journal of Pathology*, *181*(5), 1796–1806. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.07.032>
84. Horikawa, I., & Barrett, J. C. (2003). Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis*, *24*(7), 1167–1176. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg085>
85. Lantuejoul, S., Soria, J. C., Morat, L., Lorimier, P., Moro-Sibilot, D., Sabatier, L., Brambilla, C., & Brambilla, E. (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(5), 2074–2082. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1376>

86. de Blasio, A., Vento, R., & di Fiore, R. (2018). Mcl-1 targeting could be an intriguing perspective to cure cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(11), 8482–8498. <https://doi.org/10.1002/jcp.26786>
87. Chang, Y. H., Yu, C. W., Lai, L. C., Tsao, C. H., Ho, K. T., Yang, S. C., Lee, H., Cheng, Y. W., Wu, T. C., & Shiau, M. Y. (2010). Up-regulation of interleukin-17 expression by human papillomavirus type 16 E6 in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*, 116(20), 4800–4809. <https://doi.org/10.1002/cncr.25224>
88. Zhang, J., Zhang, J., Cui, X., Yang, Y., Li, M., Qu, J., Li, J., & Wang, J. (2015). FoxM1: a novel tumor biomarker of lung cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(3), 3136–3140.
89. Chen, P. M., Cheng, Y. W., Wang, Y. C., Wu, T. C., Chen, C. Y., & Lee, H. (2014). Up-regulation of FOXM1 by E6 oncoprotein through the MZF1/NKX2-1 axis is required for human papillomavirus-associated tumorigenesis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(11), 961–971. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.09.010>
90. Muñoz, J. P., González, C., Parra, B., Corvalán, A. H., Tornesello, M. L., Eizuru, Y., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038178>
91. Alam, S., Conway, M. J., Chen, H. S., & Meyers, C. (2008). The cigarette smoke carcinogen benzo[a]pyrene enhances human papillomavirus synthesis. *Journal of virology*, 82(2), 1053–1058. <https://doi.org/10.1128/JVI.01813-07>
92. Cheng, Y. W., Lin, F. C., Chen, C. Y., & Hsu, N. Y. (2016). Environmental exposure and HPV infection may act synergistically to induce lung tumorigenesis in nonsmokers. *Oncotarget*, 7(15), 19850–19862. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.76>