

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 (HPV16) EM AMOSTRAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO (TNBC) DE MULHERES DO ESTADO DA
PARAÍBA**

ZHILBELLY DA MOTA NUNES

**João Pessoa – PB
2020**

ZHILBELLY DA MOTA NUNES

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 (HPV16) EM AMOSTRAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO (TNBC) DE MULHERES DO ESTADO DA
PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para Obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Prof. Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel
Coorientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

João Pessoa – PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N972d Nunes, Zhilbelly da Mota.

Detecção do papilomavírus humano 16 (HPV16) em amostras de carcinoma mamário triplo negativo (TNBC) de mulheres do estado da Paraíba / Zhilbelly da Mota Nunes. - João Pessoa, 2020.

62 f. : il.

Orientação: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel.

Coorientação: Antônio Carlos de Freitas.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer de mama. 2. Papilomavírus humano (HPV). 3. Triplo negativo (TNBC). 4. Papilomavírus humano de alto risco (HR HPV). I. Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz. II. Freitas, Antônio Carlos de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 618.19-006(043)

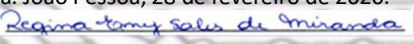


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

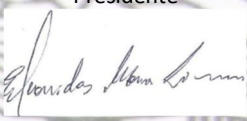


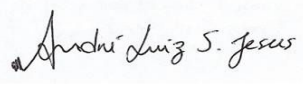
Ata da Sessão Pública para avaliar o Trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Mestranda **Zhilbelly da Mota Nunes**, submetida para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

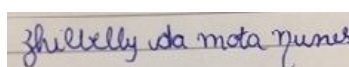
Aos vinte e oito do mês fevereiro do ano de dois mil e vinte, às quatorze horas, no auditório do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal da Paraíba – Campus I, em João Pessoa-PB, reuniram-se em cerimônia pública, os membros da banca examinadora, composta pelos Professores Doutores: **Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel (Orientador/Presidente)**, **Eleonidas Moura Lima (examinador interno)**, **André Luiz Santos de Jesus (Examinador interno)** a fim de examinarem a candidata **Zhilbelly da Mota Nunes** ao grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Além dos examinadores e da examinada, compareceram, também, representantes do corpo discente. Iniciando a sessão, a Professora Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel, na qualidade de Presidente da banca, comunicou aos presentes qual o fim da reunião e os procedimentos de encaminhamentos da mesma. A seguir, concedeu a palavra à candidata para que a mesma fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado **“DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 (HPV 16) EM AMOSTRAS DE CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO (TNBC) DE MULHERES DO ESTADO DA PARAÍBA”**. Concluída a exposição, a Senhora Presidente solicitou que fosse feita a arguição por cada um dos examinadores. Após a candidata ser arguida por cada membro examinador, lhe foi concedido a palavra para que respondesse e esclarecesse as questões levantadas. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora passou a proceder a avaliação e julgamento da mestranda. Em seguida, a Senhora Presidente declarou que a Banca Examinadora considerou, segundo o artigo 65 do Regulamento Geral dos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Federal da Paraíba, **APROVADA** a dissertação apresentada e defendida pela mestranda **Zhilbelly da Mota Nunes** concedendo-lhe, assim, o grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular Molecular. Logo após a avaliação da comissão julgadora, o orientador preencherá um formulário, juntamente com o relatório final de dissertação de mestrado, a fim de que o mesmo seja homologado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. E, para constar, eu, Regina Emy Sales de Miranda, secretária da reunião, lavrei a presente ata, que assino junto com os membros da banca examinadora. João Pessoa, 28 de fevereiro de 2020.


Regina Emy Sales de Miranda
Secretária


Professora Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel
Presidente


Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima
Membro titular Interno


Prof. Dr. André Luiz Santos de Jesus
Membro Titular Externo



Assinatura da Mestranda

Agradecimentos

*Primeiramente a **Deus** por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos e não desanimar com as dificuldades;*

*Aos meus **queridos pais (Cristina e Ziljomar)** e **minhas irmãs (Gabrielly e Zhilda)** por incentivarem o meu crescimento profissional. Vocês são tudo para mim.*

*À minha “mãe” e querida orientadora **Ana Pavla Gurgel** por todo o incentivo e dedicação, deixando inúmeras vezes de lado seu momento de descanso para me orientar. Nunca irei esquecer. Agradeço pela paciência e enorme capacidade para me ensinar. Principalmente por ter acreditado e depositado sua confiança em mim, pois sem a senhora, nada disso seria possível e, sobretudo ainda pela pessoa admirável e grande profissional que é;*

*Ao coordenador do PGBCM, professor **Eleonidas Lima** pelo suporte acadêmico. És uma referência na pesquisa científica;*

*Aos técnicos do laboratório LBMEQ, **Sylvinha e João Ricardo** pela ajuda e suporte técnico;*

*Aos meus queridos amigos **Anderson Félix, Tamires Andrade e Jalcinês Costa**. Obrigada pelas incontáveis ajudas, por me escutarem e compartilharem comigo os melhores e piores momentos da minha vida. Levarei para sempre a amizade de vocês.*

*Aos meus amigos **Álisson Emmanuel, Ellynes Nunes, Taylla Flores, José Roberto, Mabel Vieira e Beatriz Dantas**, os meus sinceros sentimentos de gratidão pelos momentos de alegrias;*

*À **Kamylla Conceição** e ao **Professor Antônio Carlos** da UFPE pela parceria acadêmica;*

*Ao **laboratório UNILAB/ Patologia Ivan Rodrigues** por ceder as amostras;*

*À **Regina** pelas ajudas administrativas;*

*À **CAPES** pelo suporte financeiro;*

E a todos que de forma direta e indireta se fizeram presentes nessa caminhada.

Persistir, testar, falhar, descobrir e alcançar. Nós incansavelmente temos dentro de nós a ignorância e a sabedoria, lutando arduamente para alcançar o desconhecido e revelar tudo aquilo que mudará a ciência, os protocolos, as gerações de indivíduos, a medicina e a vida.

Tanto foram os feitos que nos trouxeram até aqui, tantos foram os erros e acertos, tantas foram as curas do corpo, da mente e da alma, tantos foram os desafios e tantas foram as conquistas da verdadeira sabedoria, o saber de que nada sabemos. A luta continuará sendo árdua para alcançar, através da inquietude dos cientistas, o processo solidário da cura.

Kátia Gajete

RESUMO

O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Diversos fatores endógenos e exógenos estão relacionados com o câncer de mama. Muitos estudos mostram o possível envolvimento do Papilomavírus humano (HPV) na carcinogênese mamária, porém essa relação ainda é controversa. Assim, os objetivos do presente estudo foram: 1) detectar o DNA do HPV em amostras parafinadas de câncer mama Luminal A, Luminal B, HER-2-positivo e triplo negativo (TNBC), oriundos de pacientes do Estado da Paraíba, Brasil; 2) Detectar o DNA do HPV16 em amostras TNBC de pacientes oriundos do Estado da Paraíba, Brasil; 3) Realizar um estudo de associação entre as amostras TNBC-positivo para o HPV16 e amostras TNBC-negativo para o HPV. Para tanto, a detecção do DNA viral foi realizada através da real time PCR, utilizando os primers GP5 e GP6. Para a genotipagem, foi utilizado os primers da região consenso E6 do HPV16. Em um total de 60% (60/100) das amostras de carcinoma mamário invasivo sem outra especificação (SOE) foi detectado o DNA do HPV. Deste total, foi observado o DNA do HPV16 em 100% (60/60) das amostras. Dentre as 15 amostras TNBC estudadas, 67% (10/15) apresentaram o DNA do HPV16. Não foi observado associação entre HPV e TNBC. Os resultados deste estudo sugerem que o vírus esteja em atividade nas células mamárias tumorais e provavelmente desempenhem papel na carcinogênese mamária.

Palavras-chaves: Câncer de mama, Papilomavírus humano (HPV), Triplo negativo (TNBC), Papilomavírus humano de alto risco (HR HPV).

ABSTRACT

Breast cancer is a major public health problem worldwide. Several endogenous and exogenous factors are related to breast cancer. Several studies have shown the involvement of Human papillomavirus (HPV) in the cancerous breast, although this relationship is still controversial. Thus, the aims of this study were: 1) detect HPV DNA in paraffinized breast cancer samples Luminal A, Luminal B, HER-2- positive and triple negative (TNBC), from patients in the State of Paraíba, Brazil ; 2) detect HPV16 DNA in TNBC of patients from Paraíba State, Brazil; 3) To perform a an association study between the positive and negative TNBC that were positive to HPV. For this, the detection of viral DNA was performed by real time PCR, using GP5 and GP6 primers set. For genotyping, HPV16 E6 primers were used. In total, 60% (60/100) of tumors were positive to HPV DNA. HPV16 was observed in 100% (60/60) of the tumors positive to HPV. Among TNBC, 67% (10/15) were positive to HPV16. There was no association between HPV and TNBC. The results of this study suggest that viruses are active in tumoral breast cells and play a cancerous role in the breast.

Keywords: Breast cancer, Human papillomavirus (HPV), TNBC, qPCR, High-risk human papillomavirus (HR HPV).

LISTA DE ABREVIATÖES

DBH Do inglês, *hibridization dot blot*

CM Câncer de mama/ Carcinoma mamário

CDK Quinase dependente de ciclina

CIP1 Proteinase cisteína 1 (*Cysteine proteinase-1*)

CIS Carcinoma *in situ*

CK5 Citoqueratina tipo 5

DCIS Carcinoma ductal *in situ*

E6AP Complexo E6 ligase ubiquitina celular

EGFR Receptor do fator de crescimento epidermal (*Epidermal growth factor receptor*)

ER Receptor de estrógeno (*estrogen receptor*)

EBV Epstein Barr Vírus

HE Hematoxilina e Eosina

HER-2 Receptor do fator de crescimento epidermal 2 (Epidermal growth factor receptor 2)

HPV Papilomavírus humano

HR Papilomavírus de alto risco

IC Carcinoma infiltrante

IHQ Imunohistoquímica

ISH Hibridização *in situ*

KDa Quilodaltons

LCIS Carcinoma lobular *in situ*

LR Papilomavírus de baixo risco

MMTV Vírus do Tumor Mamário Murino

NCR Região não codificante

OMS Organização Mundial de Saúde

ORF Quadro aberto de leitura

Pb Pares de bases

PCR Reação em cadeia da polimerase

PR Receptor de progesterona (*progesterone receptor*)

PV Papilomavírus

qPCR PCR em tempo real

SB Southern blot

RFLP Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição

(*Restriction fragment length polymorphism*)

SBH Do inglês, *Hibridization Southern blot*

Seq Sequenciamento

SOE Carcinoma mamário invasivo sem outra especificação

TNBC Câncer de mama triplo negativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa global mostrando a alta taxa de mortalidade causada pelo câncer de mama em pacientes com idade inferior à de 70 anos.....	1
Figura 2: Principais genes envolvidos nos fatores de riscos genéticos para desenvolver o câncer de mama.....	24
Figura 3: Principais fatores etiológicos ambientais e relacionados ao estilo de vida que estão associados a carcinogênese mamária.....	25
Figura 4: Características morfológicas do vírus HPV em microscopia eletrônica.....	27
Figura 5: Organização do genoma circular do HPV 16 mostrando localização mostrando o arranjo das proteínas precoces (E), os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região de longo controle (LCR).....	28
Figura 6: Ilustração da infecção pelo vírus HPV no colo do útero e o papel geral dos genes de expressão precoce (<i>Earlier</i>) e tardios (<i>Late</i>) que compõem a estrutura genômica dos HPV.....	30
Figura 7: Hipótese para a propagação do HPV no tecido mamário.....	35
Figura 8: Progressão do carcinoma do colo de útero.....	36
Figura 9: Diagrama esquemático mostrando as possíveis interações entre as oncoproteínas virais E6 e E7 e o receptor HER-2 e BRCA1.....	38
Figura 10: Curva de Melting do genótipo p53.....	47
Figura 11: A) Representação gráfica obtida por <i>Real Time- PCR</i> mostrando uma T _m de 78,91°C, representando o fragmento do DNA viral e B) uma T _m 81,13°C representando o fragmento do DNA do HPV 16.....	48

Figura 12: Frequência e tipificação do DNA viral.....	48
Figura 13: Frquência do HPV de acordo com a classificação molecular do CM.....	49
Figura 14: Frequência do HPV 16 nas amostras do carcinoma mamário TNBC.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação de acordo com a expressão de receptores hormonais e fatores de crescimento.....	22
Tabela 2: Classificação dos agentes virais envolvidos no processo carcinogênico, em humanos.....	26
Tabela 3: Detecção do DNA de HPV em neoplasia mamária.....	33
Tabela 4: Primers usados para detecção do DNA do HPV.....	44
Tabela 5: Primer do gene E6 utilizado para tipificação do DNA do HPV 16.....	44
Tabela 6: Caracterização das amostras de CM em relação a idade, localização anatômica, grau histológico e classificação molecular.....	46
Tabela 7: Presença do DNA do HPV de acordo com a idade, localização anatômica, grau histológico e classificação molecular dos tumores.....	49
Tabela 8: Relação entre a presença do DNA viral e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares das pacientes TNBC.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Câncer de mama.....	17
2.1.1 Epidemiologia do câncer de mama.....	17
2.1.2 Classificação do câncer de mama.....	18
2.1.3 Classificação molecular do câncer de mama.....	20
2.1.4 Etiopatogenia do câncer de mama.....	22
2.2 Papilomavírus humano (HPV).....	27
2.2.1 Genoma do HPV.....	27
2.2.2 Ciclo de infecção causada pelo HPV.....	30
2.2.3 HPV e carcinoma mamário.....	31
2.2.4 Possíveis mecanismos de associação entre E6/E7 e a carcinogênese mamária.....	35
2.2.5 Possíveis mecanismos de associação entre E6/E7 e HER-2, BRCA, ER α e PR.....	37
2.2.6 Possíveis mecanismos de associação entre E6/E7 e o TNBC.....	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41

4. METODOLOGIA	42
4.1 População de estudo	42
4.2 Extração e quantificação do DNA viral	42
4.3 Análise de detecção do gene endógeno	43
4.4 Detecção do DNA viral	43
4.5 Tipificação do DNA viral	44
4.6 Análises estatísticas	44
4.7 Aspectos éticos	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Caracterização das amostras	46
5.2 Análise da detecção do gene endógeno humano	46
5.3 Detecção e tipificação do DNA do HPV	47
5.4 Associação do carcinoma mamário TNBC com o HPV 16	50
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	55
8. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que, em 2018, foram registrados cerca de 2,09 milhões de novos casos e 627,000 mortes. Excetuando-se o câncer de pele, o câncer de mama figura como o segundo mais frequente e o quinto com maior número de mortes (WHO, 2019).

O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial, que resulta da interação de fatores genéticos, estilo de vida e fatores ambientais na manifestação desse fenótipo (SILVA, M. M. et al, 2005; DAMI, H. et al, 2008; INUMARU, L. E. et al, 2011; ANOTHAISINTAWEE, T et al., 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018; INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018). Recentes estudos têm mostrado que a combinações de variações nos genes BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM e CHEK2 em conjunto com outras 70 mutações, em distintos loci, correspondem a 30% dos casos de câncer de mama (GODET, I.; GILKES, D. M., 2017; BUYS, S. S. et al., 2017; YADAV, S. et al., 2017). Desse modo, 70% dos casos de câncer de mama são esporádicos, causados por fatores ambientais. A idade, obesidade, exposição à radiação ionizante, uso de anticoncepcional, idade da menarca, uso de álcool, reposição hormonal, sedentarismo e paridade têm sido reportados como fatores de risco para o câncer de mama esporádico (SUN Y-S; ZHAO Z; YANG Z-N et al., 2017; HILLER, T. W et al., 2020). Nesse contexto, diversos estudos tem enfatizado também a possibilidade de que infecções causadas por vírus do Tumor Mamário Murino (MMTV), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus da Leucose Bovina (LBV) e o Papilomavírus humano (HPV) sejam agentes etiológicos que atuem direta ou indiretamente na carcinogênese mamária em humanos (LAWSON, J. S et al., 2018).

O HPV é um vírus de DNA, dupla fita circular, contendo aproximadamente 8.000 pb. Infecção persistentes causada pelo HPV estão associadas com a carcinogênese em regiões anogenitais e de cabeça e pescoço (RODRIGUES AC; SCHIFFMAN M; HERRERO R et al., 2008; LAUDADIO J, 2013; GUPTA, S. M.; MANIA-PRAMANIK, J., 2019). Recentes investigações têm mostrado a presença do DNA do HPV bem como a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 em sítios não anogenitais, tais como pele, pulmão e mama (JEANNOT, E. et al., 2016; XIONG, W. M. et al., 2017; DE CAROLIS, S. et al., 2019). A presença do DNA dos HPVs 6, 11, 16, 18 e 33 e a expressão das oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs 16 e 18 já foram encontrados em carcinomas mamários (IACOPETTA, B. J. et al., 2005; SIGAROODI, A. et al., 2012). Além disso, estudos tem mostrado uma alta prevalência de HPV em câncer de mama triplo negativo em pacientes com ou sem histórico de câncer anogenital (PIANA, A. F. et al., 2014).

Apesar da importância, existem poucos estudos de prevalência do DNA do HPV em amostras de câncer de mama de pacientes oriundas do Nordeste do Brasil e nenhum estudo com a população Paraibana. Assim, o objetivo desse estudo foi detectar o DNA do HPV16 em carcinoma mamário triplo negativo de mulheres provenientes do Estado da Paraíba, Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

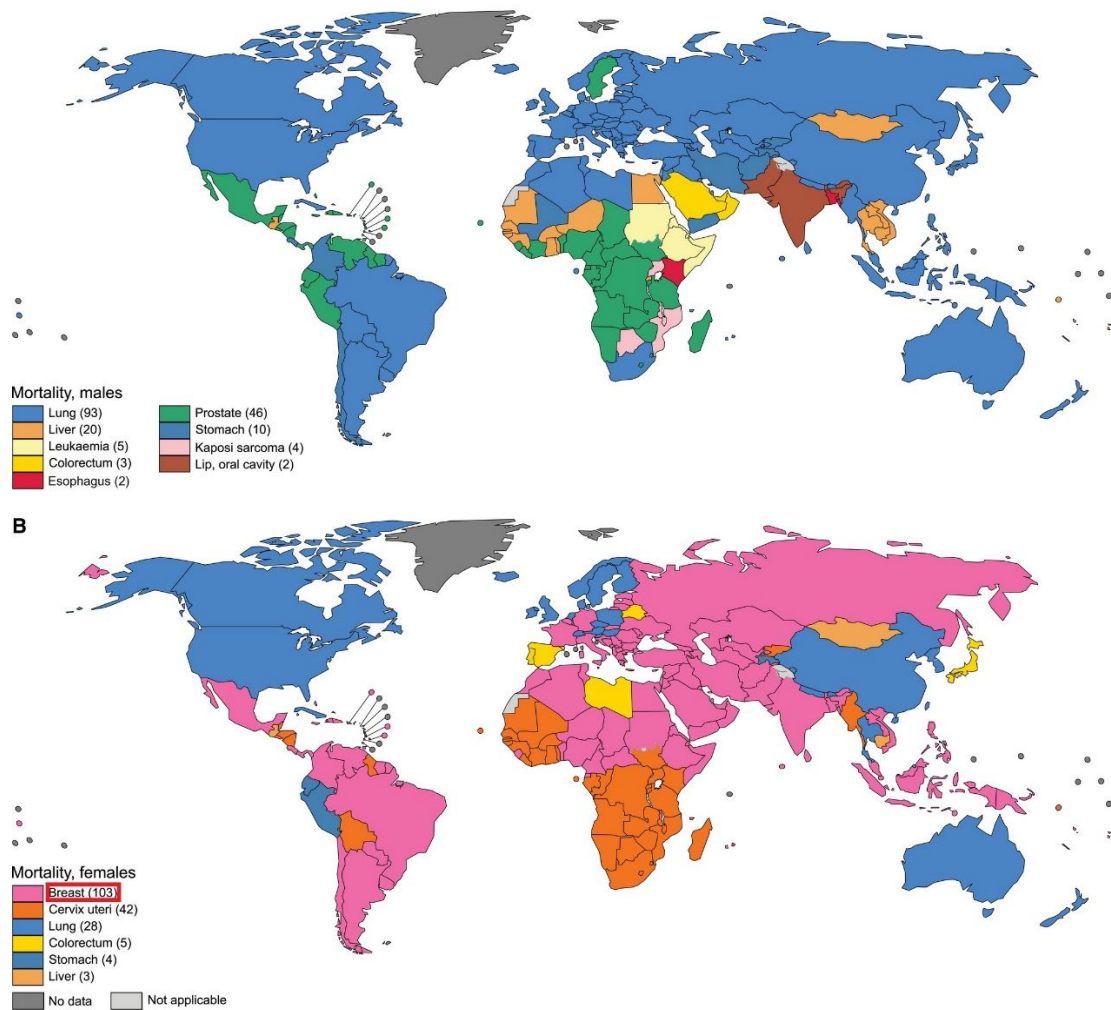
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres em todo o mundo. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que, em 2018, foram registrados cerca de 2,09 milhões de novos casos e 627,000 mortes. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama figura como o segundo mais incidente e o quinto com maior número de mortes (**Figura 1**). Em virtude desses dados, o câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (WHO, 2019).

No Brasil, o câncer de mama é o mais frequente em mulheres, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que o câncer de mama foi o mais frequente em mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil) em 2018. Na Região Norte, o câncer de mama foi segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil), ultrapassado pelo câncer de colo do útero (BRASIL, 2018).

Estimativas recentes da OMS também têm mostrado um aumento no número de casos de câncer de mama em mulheres que residem em países em desenvolvimento (WHO, 2019). De modo semelhante, no Brasil, também tem sido observado um aumento nos números de casos de câncer de mama. Nesse sentido, um estudo revelou que a taxa de mortalidade do câncer de mama em mulheres brasileiras aumentou de 1,8%, no período de 1991 a 1994, para 2,6% no intervalo de 2007 a 2010. No mesmo período, a taxa de mortalidade permaneceu constante no Sul, diminuiu no Sudeste e manteve-se alta nas demais regiões, especialmente no Nordeste, com crescimento significativo de 106%. Além disso, estudos mostraram que, entre 1980 a 2009, a Paraíba foi um dos estados que obteve o maior aumento da taxa de mortalidade, com uma variação anual de 11,9% a partir do ano de 2000, ficando atrás apenas do Maranhão, que atingiu a variação de 12% a partir do ano de 2006 (TESSARO S. et al., 2001; VASCONCELOS AB. et al, 2001; FREITAS-JUNIOR, R. et al., 2012; KLUTHCOVSKY et al, 2014).

Figura 1: Mapa global mostrando a alta taxa de mortalidade causada pelo câncer de mama em pacientes com idade inferior à de 70 anos.



Fonte: GLOBOCAN, 2018.

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

Historicamente, o câncer de mama é compreendido como um tipo de neoplasia com diferentes características histopatológicas e diferentes respostas ao tratamento, variando de acordo com o paciente. Nos últimos 40 anos, diversos estudos genéticos, moleculares e histopatológicos foram feitos na tentativa de compreender a heterogeneidade do câncer de mama e, assim, implementar uma terapia individualizada para cada paciente. Os resultados

desses estudos permitiram uma mudança nos antigos sistemas de classificação do câncer de mama (PERON, C.M. et al., 2000; VAN'T VEER, L. J. et al., 2002; VERONESI, U. et al., 2005; BYRD, D. R. et al., 2010; GATZA, M. L. et al., 2010; ALLISON, K. H., 2012; SINN, H. P., & KREIPE, H., 2013; ELIYATKIN, N., 2015). Assim, de acordo com a OMS (2013), a classificação do câncer de mama abrange não somente os cânceres invasivos, mas também lesões precursoras, lesões de baixo potencial maligno, proliferações epiteliais benignas, neoplasias fibroepiteliais, mioepiteliais e mesenquimais (**Figura 2**). Além disso, a atual classificação abrange também aspectos morfológicos, genéticos e moleculares dos tumores. De modo geral, as lesões na mama são atualmente classificadas como:

- **Lesões precursoras:** As lesões precursoras são subdivididas em carcinoma ductal *in situ* (do Inglês, *ductal carcinoma in situ*, DCIS) e a neoplasia lobular (do Inglês, *lobular neoplasia*, LN). Além disso, a LN são subclassificadas em lobular carcinoma *in situ* (do Inglês, *lobular carcinoma in situ* LCIS) e hiperplasia lobular atípica (do Inglês, *atypical lobular hyperplasia in situ* LCIS) (BUERGER, H. et al., 2000; MIDDLETON, L. P. et al., 2003).
- **Lesões proliferativas intraductais:** Esse grupo de tumores são subdivididas em hiperplasia ductal não usual, lesões de células colunares e hiperplasia ductal atípica (MARSHALL, L. M. et al., 1997; ARONER, S. A. et al., 2009; COSTARELLI, L. et al., 2012);
- **Lesões papilares:** São tumores subclassificados em papiloma intraductal, carcinoma papilar intraductal, carcinoma papilar encapsulado e carcinoma papilar sólido (MURAD, T. M. et al., 1997; JORNS, J. M. et al., 2016);
- **Carcinoma invasivo:** Os carcinomas invasivos são subclassificados em 10 tipos de tumores, nomeadamente carcinoma do tipo não especial, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma cribriforme, carcinoma mucino, carcinoma com características medulares, carcinoma com diferenciação apócrina, carcinoma com células diferenciadas signet-ring, carcinoma micropapilar invasivo, carcinoma metaplásico do tipo não especial (TAVASSOLI, F. A., 2003; ROSAI, J., 2011);
- **Tumores de origem epitelial/mioepitelial:** Esse grupo de tumores são classificados em Carcinoma com adenomioepitelioma e carcinoma adenoide cístico (POLITI, M. et al., 2014);

- **Tipos raros:** Os tumores do tipo raro são subclassificados em carcinoma com características neuroendócrinas, carcinoma secretório, carcinoma papilar invasivo, carcinoma de células acínicas, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma polimorfos, carcinoma oncocítico, carcinoma *lipid-rich*, carcinoma de células *glycogen-rich* e carcinoma sebáceo (KAUFMANN, M. et al., 2010).

2.1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO

Mudanças significativas na expressão do receptor de estrógeno (RE) e do receptor da progesterona (RP), em carcinoma mamários, são utilizados na prática clínica como modelo de classificação do tipo de câncer de mama há mais de quarenta anos (THORPE, S. M., 1988; JOENSUU K; LEIDENIUS, M., KERO, M., et al., 2013). Uma década após a descoberta do envolvimento dos RE e RP nos carcinomas de mama, foi demonstrado o aumento na expressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) em alguns tumores de mama. Com isso, o marcador molecular HER-2 positivo também foi adicionado à prática clínica, tanto para a classificação bem como para a escolha do tratamento do câncer de mama (HARRIS, A. L. et al., 1989; IQBAL, N.; IQBAL, N., 2014). Subsequentemente, outros marcadores moleculares também foram incorporados à prática clínica, com fins de diagnóstico e tratamento, tais como o Ki-67 (também conhecida como MIB1), citoqueratina 5 (CK5) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (KORNEGOOR, R. et al., 2012).

Mais recentemente, diversos estudos de expressão gênica têm mostrado que o câncer de mama resulta de uma coleção de diferentes doenças, que afeta um mesmo órgão, sendo originado das mesmas estruturas atômicas e que apresenta diferentes características histopatológicas, resposta ao tratamento e prognóstico. Os resultados desses estudos de expressão gênica classificam os tumores de mama em quatro grandes grupos (**Tabela 1**):

- **Luminal A** – São tumores que apresentam elevada expressão do RE, do gene de regulação SLC39A6, fatores de transcrição GATA3, FOX, XBP1 e das citoqueratinas 8 e 18. Esses tipos de tumores não apresentam grandes quantidades de mutações e são diploides de baixo grau (HULKA, B. S., 1996; VERONESI, U. et al., 2005; POLYAK, K., 2007; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001; COLDITZ, G. A., 2012; ALLISON, K. H., 2012);
- **Luminal B** – São tumores que apresentam baixa expressão do RE e são mais proliferativos. Apresentam mutações nos genes da TP53 e PIK3CA, são auneuploides e uma taxa dos tipos luminais B apresentam HER-2 positivo (HULKA, B. S., 1996; VERONESI, U. et al., 2005; POLYAK, K., 2007; COLLABORATIVE GROUP ON

HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001; COLDITZ, G. A., 2012; ALLISON, K. H., 2012);

- **HER-2 positivo** – Esse grupo de tumores tem como características a elevada expressão dos genes ERBB2, GRB7, MED24 e MED1 e apresentam maior agressividade (HULKA, B. S., 1996; VERONESI, U. et al., 2005; POLYAK, K., 2007; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001; COLDITZ, G. A., 2012; ALLISON, K. H., 2012);
- **Basal-símile** – Esse grupo de tumores são caracterizados com superexpressão das citoqueratinas 5 e 17, LAMC1, ANXA8 e CDH3. São negativos para RE, RP, HER-2 e positivos para EGFR ((HULKA, B. S., 1996; VERONESI, U. et al., 2005; POLYAK, K., 2007; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2001; COLDITZ, G. A., 2012; ALLISON, K. H., 2012; YERSAL, O.; BARUTCA, S., 2014).

Os tumores basal-símile são também comumente denominados carcinoma mamário triplo negativo (TNBC). Contudo, estudos de expressão gênica tem mostrado que os TNBC são um grupo de tumores que apresentam uma grande heterogeneidade, do qual os tumores basal-símile fazem parte. A maioria dos tumores TNBC são carcinomas do tipo sem outra especificação (SOE) e ductal invasivo (DSCI). Do ponto de vista molecular, esses tumores caracterizam-se por não expressarem os RE, RP e o oncogene HER-2. Os TNBCs são subdivididos em *basal-like* e *claudin-low*; os TNBC *basal-like* são mais comumente encontrados em mulheres jovens e de origem africana. Esse grupo de tumores caracterizam-se por serem carcinoma invasivo com índice mitótico aumentado, necrose tumoral e resposta linfocítica estromal, além de apresentarem uma maior frequência em portadores de mutações nos genes BRCA1 e TP53. Por outro lado, nos TNBC do tipo *claudin-low*, não ocorre a expressão de genes relacionados às junções de adesão intercelular. Os TNBCs representam aproximadamente 15% de todos os carcinomas mamários (RAHKA E.A., EI-SAYED M.E., GREEN A.R., et al. 2007; FOULKES, W. D.; SMITH, I. E.; REIS-FILHO, J. S., 2010; STREHL, J. D.; WACHTER, D. L.; FASCHING, P. A. et al., 2011; EROLES, P.; BOSCH, A., PÉREZ-FIDALGO, J. A. et al., 2012; SHAH, S. P.; ROTH, A., GOYA, R. et al., 2012; WANG, D.Y.; JIANG, Z., BEN-DAVID, Y., et al., 2019).

Tabela 1: Classificação de acordo com a expressão de receptores hormonais e fatores de crescimento.

Subtipos moleculares	RE	RP	HER-2	Ki-67
Luminal A	+	+	-	<14%
Luminal B	+	+	+/-	≥14%
Super HER-2	-	-	+	
TNBC				
<i>Basal- like</i>	-	-	-	
<i>Claudin-low</i>	-	-	-	

Fonte: ADAPTADO de Eroles et al. (2013); RE, receptor de estrógeno; RP, receptor de progesterona; HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*.

2.1.4 ETIOPATOGENIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença heterogênea, multifatorial e complexa, com a interação de fatores genéticos, ambientais e estilo de vida na manifestação desse fenótipo (MARTIN, A. M.; WEBER, B. L., 2000). O sexo feminino é o principal fator para o risco. Embora homens também desenvolvam a doença, o câncer de mama é muito mais frequente em mulheres (MARGOLESE, R. G.; FISHER, B., HORTOBAGYI, G. N., et al., 2000). A idade avançada também é um fator de risco para o câncer de mama, sendo as mulheres acima de 55 anos o grupo mais susceptível para desenvolver a doença. A reposição hormonal, uso de anticoncepcionais, menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade também são fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama e estão relacionados à exposição prolongada do estrógeno. Obesidade e gravidez tardia são também considerados fatores de risco (AICH, R. K.; MONDAL, N. K., CHHTUI, B. et al., 2016).

Os resultados dos clássicos estudos genético-epidemiológicos, realizados com famílias e gêmeos monozigóticos e dizigóticos, mostraram que o câncer de mama apresenta uma forte componente genética. Ter parente de primeiro grau com câncer de mama dobra o risco de desenvolver o câncer de mama ao longo da vida. A etnia também é um outro fator de riscos para a doença. Mulheres brancas são mais propensas quando comparadas às afro-americanas. As mulheres asiáticas, hispânicas e americanas têm um risco menor de desenvolver a doença. Diversos estudos mostraram que mulheres mais altas têm maior risco de desenvolver câncer de mama quando comparada às mulheres mais baixas. As hipóteses para isso não estão bem esclarecidas, mas podem estar relacionados com fatores que afetam o crescimento precoce, como nutrição no início da vida, além de fatores hormonais ou genéticos. Mulheres com mamas densas têm um risco dobrado de desenvolver câncer de mama quando comparadas às mulheres com densidade mamária mediana. Vários fatores

podem afetar a densidade da mama, como idade, menopausa, uso de certos medicamentos (incluindo terapia hormonal da menopausa), gravidez e fatores genéticos (ROWELL, S., 1994; MACK, T. M., 2002; SIEGEL, R. L.; FEDEWA, S. A., MILLER, K. D. et al., 2015; MUCCI, L. A.; HJELMBORG, J. B., HARRIS, J. R., et al., 2016; POWER, E. J.; CHIN, M. L.; HAQ, MOHAMED M., 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Nessa perspectiva, uma análise global do genoma de 12,000 pacientes com câncer de mama e 18,000 indivíduos saudáveis mostrou que o câncer de mama agrega em famílias e apresenta uma forte componente herdável. Tal herança é o resultado da combinação de variantes nos genes BRCA1, BRCA2, PALB2 e CHEK2 com variações genéticas comuns encontradas em 70 *loci* distintos. Os resultados desses estudos mostraram que 30% de todos os tipos de câncer de mama são causados por fatores genéticos e 70% são câncer de mama esporádico (MIKI, Y.; SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., et al., 1994; WOOSTER, R.; BIGNELL, G., LANCASTER, J., et al., 1995; RENWICK, A.; THOMPSON, D., SEAL, S. et al., 2006).

O gene BRCA1 (localizado no cromossomo 17q21.31), está relacionado em aproximadamente 90% dos casos de carcinoma mamário familiar, enquanto o BRCA2 (localizado no cromossomo 13q13.1) é encontrado em maior predominância no carcinoma mamário em homens. Esses genes podem sofrer mutações e inativação, alterando sua função na célula. Mulheres com mutações no gene BRCA1 tem de 7 a 10 chances de desenvolver o câncer de mama. Este risco também é aumentado se outros membros da família apresentarem as mesmas mutações. As mulheres jovens são as mais propensas a serem diagnosticadas com a doença desencadeada pela mutação no gene BRCA1 (GARGIULO, P.; PENSABENE, M., MILANO, M et al., 2016; LARSEN, M. J.; THOMASSEN, M., GERDES, A. M. et al., 2014).

Outro gene estudado no desenvolvimento de várias neoplasias é o TP53 (localizado no braço curto do cromossomo 17), que atua modulando o ciclo celular através do bloqueio da divisão celular entre as fases G1 e S. No carcinoma mamário, mutações no TP53 estão relacionadas com uma maior agressividade da doença e conseqüentemente um prognóstico sombrio. Mutações herdadas desse gene causam a síndrome de *Li-Fraumeni*. As mulheres com essa síndrome têm um risco aumentado de câncer de mama (BØRRESEN-DALE, A. L., 2003; DAMINENI, S. R., 2014; NANDIKOLLA, A. G. et al., 2017).

O gene ATM (localizado no cromossomo 11q22.3) auxilia no reparo do DNA e participa do processo de apoptose da célula, em situações em que os sistemas de reparo do DNA falham. A herança de 2 cópias anormais desse gene causa a doença *ataxia-telangiectasia*, que foi associada a uma alta taxa de câncer de mama em algumas famílias. O gene CHEK2 (localizado no cromossomo 22q12.1), é outro gene que normalmente atua no reparo do DNA.

Mutações no gene CHEK2 aumenta o risco para o câncer de mama. O gene PTEN (localizado no cromossomo 10q23.31) normalmente ajuda a regular o crescimento celular. Mutações herdadas nesse gene podem causar a síndrome de *Cowden*, um distúrbio raro em que as mulheres apresentam um risco maior de tumores de mama benignos e malignos (LAVIN, M., 1998; APOSTOLOU, P., 2017; KIMURA, F., 2017).

O gene CDH1 (localizado no cromossomo 16q22.1), uma molécula de adesão celular dependente de íons cálcio que funciona no estabelecimento e manutenção da morfologia das células epiteliais durante a embriogênese e a idade adulta. Mutações herdadas nesse gene causam câncer gástrico difuso hereditário, uma síndrome na qual as pessoas desenvolvem um tipo raro de câncer de estômago. Mulheres com mutações nesse gene também têm um risco aumentado de câncer de mama lobular invasivo. Indivíduos com mutações no gene STK11 (localizado no cromossomo 19p13.3) podem desenvolver a síndrome de *Peutz-Jeghers*. As mulheres afetadas por esse distúrbio apresentam pigmentações nos lábios e na boca, pólipos (crescimento anormal) no trato urinário e digestivo e maior risco de muitos tipos de câncer, incluindo câncer de mama. O gene PALB2 (localizado no cromossomo 16p12.2) produz uma proteína que interage com a proteína produzida pelo gene BRCA2. Mutações nesse gene podem levar a um maior risco de câncer de mama (TANDAY, S., 2014; CORSO, G., 2016; LIPSA, A., 2019).

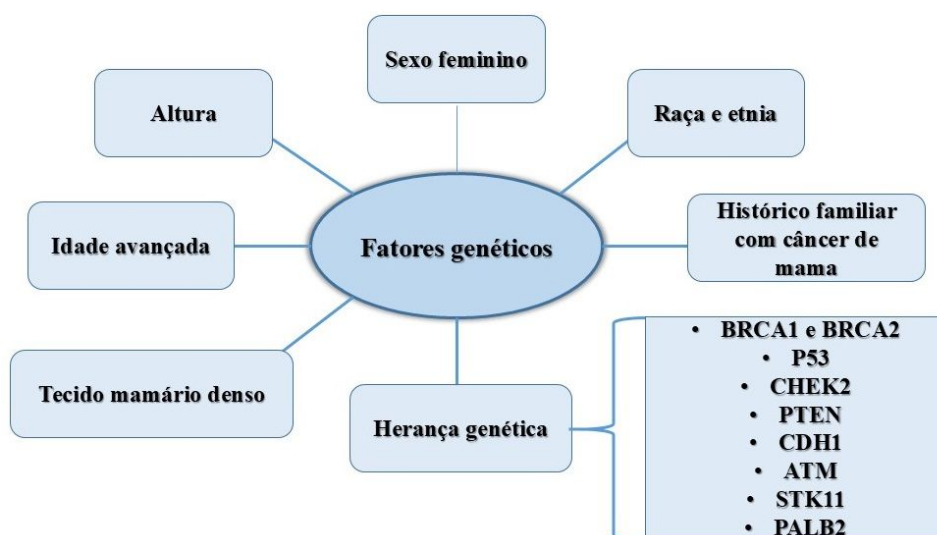


Figura 2: Principais fatores genéticos de riscos e os principais genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama. Alterações genéticas (mutações) transmitidas pelos pais nos genes BRCA1 e BRCA2, PTEN, TP53, PALB2, CHEK2, STK11, ATM e CDH1 têm sido associados ao câncer de mama.

Dentre os fatores ambientes associados a doença encontram-se a exposição à radiação ionizante (raios X e raios gama, radiações eletromagnéticas, raios alfa, raios beta), tratamento prévio com radioterapia (como no tratamento do linfoma de Hodgki), contato com

pesticidas, metais pesados, solventes, poluição do ar e da água (CLAPP, R. W.; JACOBS, M. M.; LOECHLER, E. L., 2008).

Diversos estudos mostram que o estilo de vida e a dieta também estão relacionados com o câncer de mama. Comer produtos ricos em gordura, levando ao excesso de peso ou obesidade, bem como produtos processados, que contêm uma variedade de substâncias químicas usadas para melhorar o sabor ou preservar os alimentos, pode ser um fator que promove o processo de transformação neoplásica nas células das glândulas mamárias. Falta de atividade física e o consumo de álcool também são fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (LA VECCHIA, C. et al., 1987; LEVI, F.; LA VECCHIA, C., GULIE, C. et al., 1993; XIAO, Y. et al., 2019).



Figura 3: Principais fatores etiológicos ambientais e relacionados ao estilo de vida que estão associados a carcinogênese mamária.

Além dos fatores genéticos, fatores ambientais e estilo de vida, diversos estudos tem mostrado que infecções virais podem estar relacionadas com a etiopatogenia do câncer. Nesse cenário, estimativas da OMS mostram que cerca de 15,4% do total de casos de câncer são causados por agentes biológicos. Deste total, 9,9% são causados por infecções virais persistentes. Os oncovírus incluem tanto os vírus cujo material genético é o DNA quanto os vírus de RNA. Vírus de DNA relacionado com a carcinogênese são o Herpesvírus Humano 8 (HHV-8), Poliomavírus de células de Merkel (MCPyV), Poliomavírus humano BK/JC, Vírus Epstein-Baar (EBV), vírus da Hepatite B (HBV), Papilomavírus Humano (HPV). Os vírus de RNA que estão associados com a carcinogênese em humanos são os vírus Linfotrópico de Célula T Humana (HTLV-1), o vírus da Hepatite C (HCV) e o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M., et al., 2013; MUI, U. N.; HALEY, C. T.; TYRING, S. K., 2017; WHO, 2019) (**Tabela 2**).

Tabela 2- Classificação dos agentes virais envolvidos no processo carcinogênico, em humanos. 1- Carcinogênico para humanos; 2A-provavelmente carcinogênico para humanos; 2B-possivelmente carcinogênico para humanos.

AGENTE BIOLÓGICO	CLASSIFICAÇÃO	
	IARC	ANO
Herpesvírus Humano 8 (HHV-8)	1	2018
Poliomavírus de células de Merkel (MCPyV)	2B	2018
Poliomavírus humano BK	2B	2018
Poliomavírus humano JC	2B	2018
Vírus Epstein-Baar (EBV)	1	2018
Vírus da Hepatite B (HBV)	1	2018
Papilomavírus Humano (HPV)	1/2A/2B	2018
Vírus Linfotrófico de Célula T Humana (HTLV-1)	1	2018
Vírus da Hepatite C (HCV)	1	2018
Vírus da Imunodeficiência Humana	1/2B	2018

Os oncovírus são classificados como agentes carcinogênicos diretos e indiretos. Oncovírus são carcinogênicos diretos quando apresentam oncogenes virais, cujas proteínas atuam diretamente no processo de transformação celular. Por outro lado, oncovírus com ação carcinogênica indireta causam inflamação crônica e, em consequência disso, a transformação celular. Os oncovírus atuam como carcinogênico através de algumas vias celulares. Por exemplo, algumas proteínas virais inibem a via da p53 e do retinoblastoma. Outros vírus possuem como alvo o fator de necrose tumoral, telomerasas transcriptase reversa, a via PI3K-AKT-mTOR, β -catenina, entre outros (ZUR HAUSEN, H., 2002; AL MOUSTAFA, A.E.; FOULKES, W. D., WONG, A., et al, 2004; CHEN, S.; XUE, Y., WU, X. et al., 2014; ALIBEK, K.; KAKPENOVA, A., MUSSABEKOVA, A. et al., 2013; MORALES-SÁNCHEZ, A.; FUENTES-PANANÁ, E. M., 2014; CHEN, B.S.; LI, C.W., 2016).

Um agente biológico é considerado direto ou indiretamente carcinogênico se: (1) se o DNA do vírus for persistente em tumores; (2) se forem observadas expressão dos genes virais;

(3) se a expressão dos genes virais modificarem os genes da célula hospedeira; e (5) se houver dados epidemiológicos que mostrem um risco a mais do desenvolvimento do câncer em decorrência da infecção viral (MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MUNGER, K., 2008; MORALES-SÁNCHEZ, A.; FUENTES-PANANÁ, E. M., 2016).

Nesse cenário, diversos estudos tem demonstrado que infecções persistente causadas pelos Tumor Mamário Murino (MMTV), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus da Leucose Bovina (LBV) e o Papilomavírus humano (HPV) são agentes etiológicos que atuam direta ou indiretamente na carcinogênese mamária em humanos (LAWSON, J. S.; GLENN, W. K., 2017).

2.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

2.2.1 GENOMA DO HPV

A infecção causada pelo HPV é mais comum em sítios anogenitais e de cabeça e pescoço e é o principal agente etiológico de lesões pré-cancerosas, que podem progredir para o câncer do colo do útero em mulheres, câncer de pênis em homens e câncer anal nos respectivos sexos (WHO, 2017).

Os Papilomavírus (PVs) pertencem a família *Papillomaviridae*, que inclui 16 gêneros distintos. Os PVs são vírus não envelopados de DNA, dupla fita circular, que exibem um envoltório proteico denominado capsídeo, formado por 72 capsômeros compostos por duas proteínas estruturais L1 e L2. Os PVs medem aproximadamente 55 nm de diâmetro (ZUR HAUSEN, H., 1996; ZUR HAUSEN, H., 2009; ARALDI, R. P.; ASSAF, S. M. R., CARVALHO, R. F. D et al., 2017).

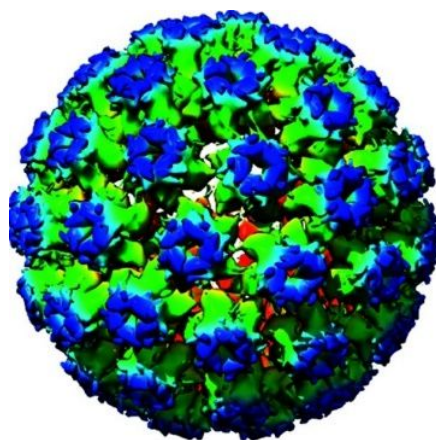


Figura 4: Características morfológicas do vírus HPV em microscopia eletrônica. A microscopia eletrônica é o único método que diagnostica o vírus diretamente.

Fonte: VAN DOORSLAER K. et al., 2013.

Tal como um PVs, o HPV é um vírus de DNA, dupla fita circular, contendo em torno de 8.000 pares de bases (pb) associados com histonas (ZUR HAUSEN, 1996). O HPV apresenta oito quadros abertos de leituras (do Inglês, *Open Reading Frames- ORFs*), dividindo-se em duas regiões de acordo com a expressão dos genes virais durante o ciclo de infecção viral: A região de expressão precoce, denominada *Early* (E) e a região de expressão tardia, denominada *Late* (L). Entre essas duas regiões, encontra-se a região não codificante denominada Região Longa de Controle – *long control region* (LCR) ou *upstream regulatory region* (URR). Esta região é composta por um segmento de aproximadamente 850 pb, situada entre os genes L1 e E6, corresponde a uma fração de 10% do genoma total, contendo, na sua estrutura, a origem de replicação viral (denominada de ORI) e alguns sítios de transcrição gênica (ZUR HAUSEN, 1996, 2002; CHEN, Z.; SMITH, B. et al., 2011; SCHIFFMAN, M., HERRERO, R., et al, 2011; BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z., 2013; SCHWARTZ, S., 2013).

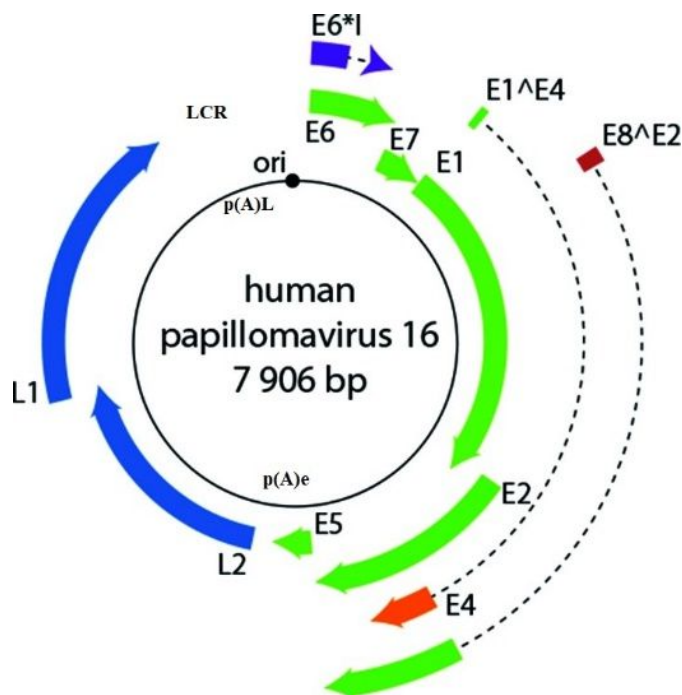


Figura 5: Organização do genoma circular do HPV 16 mostrando localização mostrando o arranjo das proteínas precoces (E), os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região de longo controle (LCR).

Fonte: (adaptado de VAN DOORSLAER K. et al., 2013.).

A região precoce E constitui mais de 50% do tamanho total do genoma e codifica as proteínas não estruturais E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A proteína E1 atua no processo de replicação viral, transformação celular e no controle transcricional do vírus. A proteína E1 também desempenha funções na iniciação e catálise da síntese do DNA viral. A proteína E2 está envolvida em vários processos, principalmente na transcrição e replicação viral. Uma característica importante das proteínas E2 é sua capacidade em ser expressar em estágios

iniciais e intermediários do ciclo viral. A proteína E4 controla a maturação viral, facilita a liberação de vírions e pode ser utilizado como biomarcador de infecção viral ativa (BERNARD, H. U., 2013; DOORBAR, J.; QUINT, W., BANKS, L., et al., 2013; MCBRIDE, A. A., 2013).

As proteínas E5, E6 e E7 são oncogenes relacionados ao processo inicial e desenvolvimento tumoral. E5 é uma proteína transmembrana e tem como função a transformação celular e modulação do sistema imunológico. As oncoproteínas E6 e E7 realizam a imortalização de queratinócitos, mas sua eficiência biológica é aumentada quando são expressas em conjunto. E6 ativa a expressão da telomerase e age na modulação da atividade das proteínas contendo o domínio PDZ. E7 é uma proteína acessória que não é codificada por todos os tipos de HPV. E7 também influencia no controle do ciclo celular mediante a interações com as histona desacetilases, ciclinas e inibidores de quinases dependente da ciclina (CDK). Além disso, E7 inativa a proteína pRb, cooperando para progressão tumoral. A inativação de pRb aumenta os níveis de p53 que é degradada por E6 (BERNARD, H. U., 2013; DOORBAR, J.; QUINT, W., BANKS, L., et al., 2013; MCBRIDE, A. A., 2013).

Os genes presentes na região de expressão tardia (L) são estruturais e denominados L1 e L2. Essas genes estruturais codificam para as proteínas do capsídeo viral. A proteína L1 é a maior, a principal proteína estrutural e altamente conservada em todos os tipos de HPV. O sequenciamento do gene L1 dos HPVs é uma importante ferramenta para a identificação e classificação de novos tipos de HPV (BREDELL H; SMITH J.J; GORGENS F.J., 2018; Z CHEN; Y JING; Q WEN., 2016).

Além dessas regiões estruturais do vírus, o genoma é formado por duas regiões não traduzidas (*Non coding region*, NCR1) e *Long control Region*, (NCR2 ou LCR) responsáveis pela regulação transcricional e replicação viral. Entre os genes E5 e L2, existe o sítio de poliadenilação (pAE), que tem como função regular a expressão dos genes da fase precoce da expressão viral. A região LCR está localizada entre o gene L1 e E6 e apresenta vários sítios de ligação para os fatores de transcrição celular e viral, regiões promotoras e uma região responsável pela replicação viral (CHEN, X. S.; GARCEA, R. L., GOLDBERG, I. et al., 2000; ZUR HAUSEN, 1996, 2002).

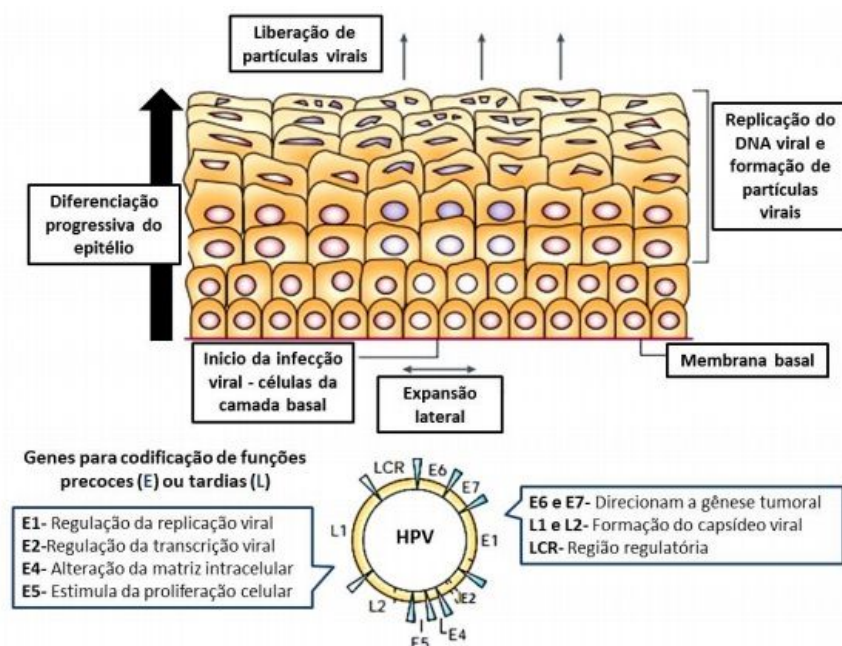


Figura 6: Ilustração da infecção pelo vírus HPV no colo do útero e o papel geral dos genes de expressão precoce (*Earlier*) e tardios (*Late*) que compõem a estrutura genômica dos HPVs.

Fonte: (ADAPTADO DE: ZUR HAUSEN, 2002).

Até a data, aproximadamente 200 genótipos do HPV são conhecidos. Os dois principais gêneros são o alfa-PVs e os beta-PVs. Os alfa-PVs compreende os HPVs genitais. Os HPV genitais de alto risco oncogênico são apontadas como os dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e 68, considerados como agentes biológicos carcinogênicos. Os HPV16 e 18 são os mais frequentemente encontrados em câncer anogenital e de cabeça e pescoço (BURD, E. M., 2003; KOBAYASHI, K.; HISAMATSU, K., SUZUI, N., et al., 2018).

2.2.2 CICLO DE INFECÇÃO CAUSADA PELO HPV

A transmissão horizontal mais frequente do HPV é pelo contato direto pele-pele ou pele-mucosa. Além disso, o vírus também pode ser transmitido pelo contato anogenital, como o introito e a infecção espalhar para outro local por auto-inoculação. Estudos também demonstram a possibilidade de transmissão do HPV através da região oral, práticas sexuais digital-vaginal e utilização de acessórios sexuais (KOUTSKY, 2000; MARRAZZO et al., 2001; GERVAZ, P. et al., 2003; IARC MONOGRAPHS, 2009; MARRAZZO; STINE; SCHAFFER, 2015; DING; ROSE, 2011; IARC MONOGRAPHS, 2009; CAVALCANTE, G. H. O., 2018).

O ciclo biológico do HPV é associado ao processo de diferenciação do epitélio do hospedeiro infectado pelo vírus, ou seja, a expressão gênica e o ciclo de infecção viral segue o processo de diferenciação dos queratinócitos, a começar pela camada basal até o estrato córneo. De modo geral, o HPV penetra na mucosa através de micro-abrasões até alcançar as

células epiteliais basais. Posteriormente, o HPV entra nas células basais através do processo de endocitose. Após a entrada do HPV no interior da célula, ocorre a decomposição da capa protéica e o DNA viral é conduzido ao núcleo da célula, em sua forma episomal. Alternativamente, uma parte do genoma do HPV pode se integrar na célula hospedeira e, assim, iniciar o processo de transformação celular (MÜNGER, K.; BALDWIN, A., EDWARDS, K. M. et al., 2004; MOUGIN, C.; NICOLIER, M.; DECRION-BARTHOD, A. Z., 2008; IARC MONOGRAPHS, 2009; MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A., 2010; CARTER, J.R.; DING, Z.; ROSE, B.R., 2011; TAMAROZZI, E. R.; GIULIATTI, S., 2018).

2.2.3 HPV E CARCINOMA MAMÁRIO

Grande parte das mulheres sexualmente ativas e infectadas pelo HPV o elimina espontaneamente, através do sistema imunológico. Porém, uma pequena quantidade da população feminina, infectadas pelo vírus, irá desenvolver uma infecção persistente com susceptibilidade a desenvolver o câncer cervical . Além do câncer cervical, infecções causadas pelo HPV também estão associadas com o processo carcinogênico em outros sítios anogenitais e de cabeça e pescoço. A presença do DNA do HPV também já foi mostrada em tumores de pulmão, pele, rins e mama (GILLISON, M. L.; KOCH, W. M., CAPONE, R. B., et al., 2000; ZUR HAUSEN, H., 2002;).

Nesse sentido, o primeiro estudo de detecção do DNA do HPV em tumores de mama foi conduzido por Di Lonardo et al. (1992), no qual foi observado que 29,4% dos tumores de mama foram positivos para o DNA do HPV16. Esse estudo pioneiro levantou a discussão sobre o papel do HPV como agente biológico direto ou indiretamente envolvido na carcinogênese mamária. Após os estudos de Di Lonardo et al. (1992), diversas investigações foram realizadas, com resultados bastante controversos. Estudos de detecção do DNA do HPV mostram uma variação de 0 a 86% da presença desse vírus em amostras de tumores de mama. Os tipos de HPVs encontrados em tecido mamário também é variável, entretanto os HPV16, 18 e 33 são os mais comumente reportados (ACETO et al., 2010; AGUAYO et al., 2011b; AKIL et al., 2008; ANTONSSON et al., 2011a; BALTZELL et al., 2012; BRATTHAUER; TAVASSOLI; O'LEARY, 1992; CAROLIS et al., 2017; CHANG et al., 2012; CHOI et al., 2016, 2007; DE CAROLIS et al., 2019; DE VILLIERS et al., 2004; DELGADO-GARCÍA et al., 2017; FERNANDES et al., 2015; GANNON et al., 2015; GLENN; WHITAKER; LAWSON, 2012; HAGHSHEENAS et al., 2016; HENNIG et al., 1999; HERRERA-GOEPFERT et al., 2013; HESKE; MENDENHALL; KINGSLEY, 2019; ISLAM et al., 2018; KHAN et al., 2008; LAWSON et al., 2009; LI; DING; ZHAI, 2015; LI et al., 2011; MENDIZABAL-RUIZ et al., 2009; MOU et al., 2011; NAUSHAD; SURRIYA; SADIA, 2017; NGAN et al., 2015; ONG; KOAY; PUTTI, 2009;

PEREIRA SUAREZ et al., 2013; PIANA et al., 2014; SALMAN et al., 2017; SILVA; DA SILVA, 2011a, 2011b; SIMÕES et al., 2012; TSAI et al., 2005; VERNET-TOMAS et al., 2015; WANG et al., 2016, 2014; WOODS IGNATOSKI et al., 2005; ZAPATKA et al., 2020).

Uma das hipóteses que explicam essa dificuldade em detectar o DNA do HPV em tecido mamário deve-se à baixa carga viral do HPV em tecido mamário. Além disso, diferenças nas estratégias metodológicas para a detecção do DNA do HPV podem resultar em falsos negativos (LINDEL, K.; FORSTER, A., ALTEMATTI, H. J., et al., 2007; DE CREMOUX, P., THIOUX, M., LEBIGOT, I. et al., 2008; HACHANA, M., ZIADI, S., AMARA, K. et al., 2010; HEDAU, S.; KUMAR, U., HUSSAIN, S., et al.; KWONG, A., LEUNG, C. P., SHIN, V. Y. et al., 2013). Uma outra explicação para a não reprodutibilidade em estudos de detecção do DNA do HPV em tecido tumoral mamário pode ser o mecanismo de *hit-and-run*, onde o vírus pode iniciar a carcinogênese e desaparecer, desencadeando em falhas nas técnicas de detecção FIMERELI, D.; GACQUER, D., FUMAGALLI, D. et al., 2015).

Além de estudos de detecção, também foram realizados estudos de carga viral e de expressão gênica dos oncogenes E6 e E7 do HPV16 e HPV18 em tumores de mama. Nesse cenário, Aguayo et al., (2011) mostraram que sequências dos oncogenes virais E6 e E7, do HPV16, estavam integradas ao genoma das células de tumores de mama. Mais recentemente, Fimereli et al., (2015) detectaram transcritos de HPV nas amostras de carcinoma mamário e também observaram a presença de sequências do DNA viral integradas ao genoma do hospedeiro. Apesar de diversos estudos corroborarem na detecção do DNA do HPV em tumores de mama e expressão dos oncogenes virais, somente a detecção do vírus não é suficiente para determinar uma relação direta com a carcinogênese mamária. Assim, ainda é controverso o papel do HPV como fator etiológico para o processo carcinogênico em mama (KHAN, N. A., 2008; BALTZELL, K., 2012; VERNET-TOMAS, M., 2015; BØNLØKKE, S.; BLAAKAER, J., STEINICHE, T., et al, 2018). Hipoteticamente, é possível supor que o vírus infecte o tecido mamário e as sequências dos oncogenes E6 e E7, dos HPVs de alto risco oncogênicos, ao se integrarem no genoma do hospedeiro, exerçam ações mutagênicas, contribuindo para a transformação das células mamárias (HAUSEN, H. Z., 2000).

Tabela 3. Detecção do DNA de HPV em neoplasia mamária

ANO	AUTOR	TIPO DO HPV	TÉCNICA	PAÍS
1992	(DI LONARDO et al)	16	PCR/ISH	ITÁLIA
1992	(BRATTHAUER et al)	6,11,16,18	PCR	EUA
1996	(CZERWENKA et al.)	6,11,16,18, 3,33,35	PCR/ISH	AUSTRÁLIA
1996	(GOPALKRISHNA et al.)	16.18	PCR	ÍNDIA
1999	(HENNING et al.)	11,16,18,33	PCR/ ISH	NORUEGA
1999	(YU et al.)	16,18, 33	PCR/SB	CHINA
2000	YU et al.)	16,18, 34	PCR/SB	CHINA
2001	(LIU et al.)	16,18, 33	PCR/ISH	EUA
2004	(DAMIN et al.)	16.18	PCR/SEQ	BRASIL
2004	(WIDSCHWENDTER et al.)	16	PCR/ELISA	ÁUSTRIA
2005	(DE VILLIERS et al.)	8,16	PCR/SEQ	EUA
2005	(KAN et al.)	16,18, 33	PCR/SEQ	AUSTRÁLIA
2005	(TSAI et al.)	16,18, 33	PCR	TAIWAN
2006	(KROUPIS et al.)	16,18, 33	PCR/RFLP	GRÉCIA
2007	(GUMUS et al.)	11,16,18,33	PCR	TURQUIA
2007	(CHOI et al.)	16, 18 e 33	PCR	CORÉIA
2008	(AKIL et al.)	16, 18, 31, 33 e 35	PCR/MIC	SÍRIA
2008	(KHAN et al.)	16, 18 e 33	PCR/qRT-PCR	JAPÃO
2009	(HE. et al.)	16	PCR	CHINA
2009	(DE LEÓN et al.)	16, 18	PCR/SEQ	MÉXICO
2009	(MENDIZABAL-RUIZ et al.)	16, 18	PCR/SEQ	MÉXICO
2009	(HENG et al.)	16 e 18	PCR/SEQ	AUSTRÁLIA
2009	(LAWNSON et al.)	16 e 18	PCR/SEQ	AUSTRÁLIA
2010	(ACETO et al.)	16 e 18	PCR/ISH	ARGENTINA
2011	(AGUAYAO et al.)	16	PCR	CHILE
2011	(ANTONSSON et al.)	18	PCR/ ISH	AUSTRÁLIA
2011	(HERRERA-GOEPFERT et al.)	16 e 31	ISH	MÉXICO
2012	(BALTEZELL et al.)	16	PCR /ISH	EUA
2012	(SIGAROODI et al.)	6, 11, 15, 16, 18, 23 e 124	PCR/SEQ	IRÃ
2013	(FRANCIS et al.)	6, 11,16,18,31 e 33	CISH	KUAWAIT
2013	(SUAREZ et al.)	6, 11, 13, 16, 18 e 87	PCR/SEQ	ARGENTINA
2014	(WANG et al.)	16	PCR	CHINA
2014	(OHBA et al.)	16,18, 31, 35, 56 e 59	MIC	SINGAPURA
2014	(MANZOURI et al.)	11, 16, 18, 33, 35, 45 e 55	PCR	IRÃ
2015	(ALI et al.)	16, 18, 31, 33	ISH	IRAQUE
2015	(FU et al.)	58	PCR	CHINA

2015	(FERNANDES et al.)	6, 11, 18, 33 e 51	RH	VENEZUELA
2015	(LI et al.)	6,18 e 16	PCR	CHINA
2016	(HAGHSHENAS et al.)	16,18	PCR	IRÃ
2016	(LIMA et al.)	6, 16, 18, 31 e 58	PCR/ISH/SEQ	BRASIL
2017	(SALMAN NA et al.)	16,18	PCR/SEQ	REINO UNIDO
2018	(KOULOURA A et al.)	24 tipos	MIC	ITÁLIA
2018	(FERNANDES A et al.)	18	PCR	VENEZUELA
2018	(NAUSHAD W. et al.)	16,18	PCR	EUA
2018	(GAFFARI H et al.)	16,18	PCR/MIC	IRÃ
2019	(RENC et al.)	16,18, 33	PCR	CHINA
2019	(DE CAROLIS, et. al.)	16,18	PCR/SEQ	ITÁLIA
2019	(BALCI FL et al.)	6,11 , 39, 82	PCR	TÚRQUIA
2019	(CAVALCANTE JR et al.)	6, 11	PCR/SEQ	BRASIL
2019	(HESKE et al.)	16,18	CUL	EUA
2020	(ZAPATKA et al.)	16,18	SEQ	ALEMANHA

ISH hibridização; RFLP do inglês, restriction fragment length polymorphism; SB: Southern blot; Seq: sequenciamento; Cul: cultura de células; MIC: MicroRNA;

(Amostras CM negativas para o HPV)

ANO	AUTOR	TIPO DO HPV	TÉCNICA	PAÍS
2015	(TOMAS V. M. et al)	16,18	PCR	ESPANHA
2018	(SARA BONLOKKE et al)	12 tipos	PCR	HOLANDA
2018	(BATZELL A.K. et al)	16	PCR	TEXAS
2018	(AFSHAR M.R. et al)	16,18	PCR	IRAN

2.2.3.1 O PAPEL DO HPV NO CARCINOMA DE MAMA

O possível mecanismo de transmissão do HPV para a mama continua ainda desconhecido. Apesar disso, algumas evidências sugerem que a rota de transmissão do HPV ao tecido mamário ocorra através do contato sexual direto do períneo com as mamas ou através da via hematogênica, com o auxílio das células mononucleadas (**Figura 8**) (BODAGHI et al., 2005; CHEN et al., 2009; ANTONSSON et al., 2011; SIMÕES et al., 2012).

A transmissão do HPV para a mama via contato sexual pode ocorrer através do trajeto oro-genital ou pelo contato direto do tecido mamário com as genitais, no qual o vírus entra no tecido mamário pelo contato com a pele através de superfícies epiteliais marceradas ou que sofreram abrasões (ZUR HAUSEN, 1996; ASHRAFI, G. H., 2005; HAGHSHENAS, M., 2013; BODILY, J., 2013; CAVALCANTE, 2018). Nesse sentido, alguns estudos detectaram a presença do DNA do HPV no tecido aerolar e leite materno, indicando a entrada do vírus no

tecido mamário pela infecção da região do mamilo e aoreola (DE VILLIERS et al., 2005; TOMMASINO, M., 2019). Alternativamente, o vírus pode sair do sítio de origem da infecção, como por exemplo a cérvix, e alcançar o tecido mamário através das vias hematogênicas e/ou linfáticas (**Figura 8**) (HENNING et al., 1999; KHAMMAPIRAD et al., 2011; (WIDSCHWENDTER et al., 2004; BODAGHI et al., 2005).

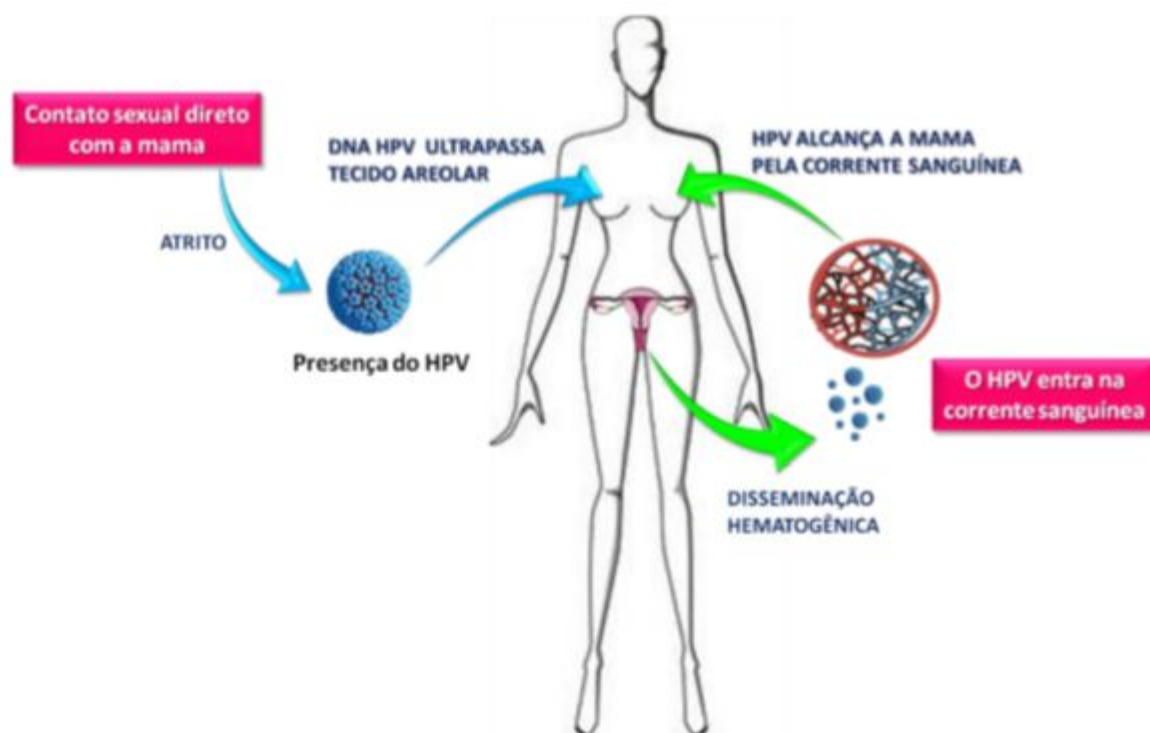


Figura 7: Hipótese para a propagação do HPV no tecido mamário. Duas probabilidades são citadas para a propagação do HPV no tecido mamário: 1) transmissão sexual através do contato direto da região genital com a mama; e 2) disseminação hematogênica pela passagem da corrente sanguínea, no qual, o DNA viral ultrapassa o sítio original da infecção atingindo o tecido mamário (LIMA E.G. et al., 2016).

2.2.3.2 POSSÍVEIS MECANISMOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE E6/E7 E A CARCINOGENESE MAMÁRIA

O fator fundamental para o processo de carcinogênese mamária é a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, levando à proliferação descontrolada e à progressão tumoral. A integração interfere no genoma do hospedeiro pela amplificação de oncogenes e a interrupção dos genes supressores de tumores, além de desencadear rearranjos inter e intra-cromossômicos (**Figura 9**) (PALL, M. L., 1981; FIMERELI, D. et al., 2015).

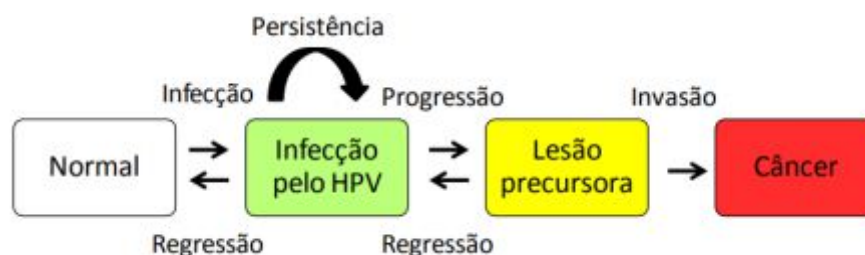


Figura 8: Progressão do carcinoma do colo de útero

No carcinoma cervical, os oncogenes dos HPVs de alto risco, E6 e E7, são responsáveis pela transformação celular devido à interação com a p53 e pRb, respectivamente. Como resultado, a interação de E6/p53 e E7/pRb atua na exarcebção do ciclo celular e ao mesmo tempo, inibe a apoptose (MÜNGER, K., 1989; SCHEFFNER, M., 1990; JEON, S., 1995; YEO-TEH, N. SL, 2018; MCBRIDE, AI A., 2017).

Na carcinogênese cervical, a superexpressão dos oncogenes virais acontece através da integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro. Posteriormente, a oncoproteína E6 auxilia na degradação da p53, via proteasoma, e causa inibição da apoptose e reparo do DNA. A degradação de p53 por E6 é importante porque a p53 é um fator de transcrição que regula a expressão de genes que codificam reguladores do ciclo celular, maquinaria de reparo do DNA, metabolismo e apoptose. Além disso, a oncoproteína E6 estimula a degradação da proteína pró-apoptótica BAK, desencadeando a instabilidade celular e permitindo a ativação da telomerase e das quinases da família *SCR* da célula hospedeira (ROSA, M. I. D., 2009; ALTAMURA, G. et al., 2018).

Semelhantemente a E6, a oncoproteína E7 desempenha a função de transformação celular envolvidos na carcinogênese cervical proveniente da infecção do HPV de alto risco oncogênico. E7 interage com a pRb pela via ubiquitina dependente. A proteína E7 inibe a atividade da pRB, que tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, desencadeando seu papel por formar complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. O E2F na sua forma livre, induz o processo de replicação do DNA. A p16, uma CDKI que inibe a fosforilação da pRB, mantendo-a ativa e ligada ao E2F, tem sua expressão controlada por feedback negativo exercido pela pRB. A inativação da pRB pela proteína E7 do HPV resulta em um aumento da expressão de p16 nas células infectadas. Além disso, a proteína E7 do HPV também se liga a p21 e p27, o que impede o controle do ciclo celular em vários pontos do mecanismo de checagem (LAVORATO-ROCHA, A. M., 2013; CIESIELSKA, U. et al., 2017).

O mecanismo da transformação induzida por E6/E7 não se limita exclusivamente à degradação dos principais “guardiões” celulares pRb e 53. E7 permite a entrada prematura

da célula para a fase S e provavelmente bloqueia a função de p21 e KIP1 (também conhecida como p27), o que desencadeia a proliferação descontrolada (KIM, Y et al., 2000; AIJAZ, S. et al., 2019).

Nesse sentido, estudos *in vitro* mostraram que as oncoproteínas E6 e E7, do HPV16 e HPV18, podem imortalizar as células epiteliais normais do tecido mamário *in vitro*, justificando a hipótese de que o vírus do HPV está associado a etiologia do carcinoma mamário. DE WAZER et al., (1995) através de culturas de células *in vivo*, utilizando as oncogenes E6 e E7 para imortalizar os múltiplos tipos de células epiteliais mamárias (MEC) no tecido mamário ou no leite, que tinham como alvo os genes supressores tumorais pRb e p53. Nesse estudo foi visto que as oncogenes E6 e E7 foram necessárias para imortalizar a MEC derivados do leite e algumas populações de células. Outro estudo realizado por BAND V et al., (1990) conclui que os produtos do genoma do HPV induzem a imortalização de células epiteliais da mama humana e reduzem a atividade dos fator de crescimento. Esse resultados aumentam a possibilidade de o HPV estar envolvido no câncer de mama. Dessa forma, alguns estudos vem sendo conduzido na tentativa de esclarecer a relação entre a presença das oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs 16 e 18 e os marcadores moleculares envolvidos na carcinogênese mamária.

2.2.3.3 MECANISMOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE E6/E7 e HER-2, BRCA, ER α e PR

HER-2 (também denominada como ErbB-2) é um receptor transmembrana que pertence à família dos receptores tirosina quinase. É um pronto-oncogene considerado como fator preditivo e presente no prognóstico do carcinoma mamário. A “*ligação*” deste receptor provocará a transmissão de um sinal para a ativação da tirosina quinasse intracelular e, esta enzima permite a fosforilação de outras tirosinas cinases que irão transmitir os sinais para proliferação, migração, adesão e transformação celular. A superexpressão de HER-2 está relacionada com mecanismos de diferentes tipos de carcinomas, principalmente o mamário. Nesse cenário, Moustafá, et al, (2004) mostraram a que os tumores de mama HER-2 positivo e positivo para o HPV são mais agressivos. Além disso, este estudo sugere que a presença das oncoproteínas E6 e E7, do HPV16, forma um complexo com HER-2, induzindo consideravelmente a transformação celular. O complexo E6/E7/HER-2 age sobre a E-caderina/catenina em carcinomas humanos. A co-expressão deste complexo reduz a expressão da E-caderina e catenina (MOUSTAFA, I. et al, 2004; YASMEEN et al., 2007; MOUSTAFA, I. et al, 2008).

A associação entre as oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs16 e 18 e o BRCA1 e BRCA2 também já foi estudada. Um estudo recente mostrou que as oncoproteínas E6/E7 do HPV

interagem com o gene BRCA1, permitindo o antagonismo de diversas ações funcionais do BRCA1. Esta interação envolve pelo menos dois pontos de contato em BRCA1, um na região N-terminal, que interage com o ER- α , e outro na região C-terminal. Além disso, mutações pontuais dentro dos domínios de zinco de E6 e E7 inativam a ligação na região N-terminal de BRCA1, reduzindo sua capacidade em resgatar a inibição de ER- α (WANG, L. et al., 2014).

Um estudo realizado por Ohba et al. (2014) mostrou que, em células tumorais da mama, o RE está significativamente associado com a infecção causadas pelos HPVs de alto risco oncogênico. Esta hipótese pode ser explicada por dois fatores: 1) o estrógeno pode afetar diretamente a transcrição dos oncogenes E6 / E7 do HPV16 no carcinoma mamário; ou 2) as células ER-positivo pode ser um alvo inicial normal do HPV, porque estas células são ativadas por um aumento da sinalização de estrógeno. Neste caso, o HPV pode exercer um papel no carcinoma mamário precoce, já que que existem hipótese de uma possível associação entre estrógenos e da HR-HPV E6 / E7 nos estágios iniciais de carcinoma mamário.

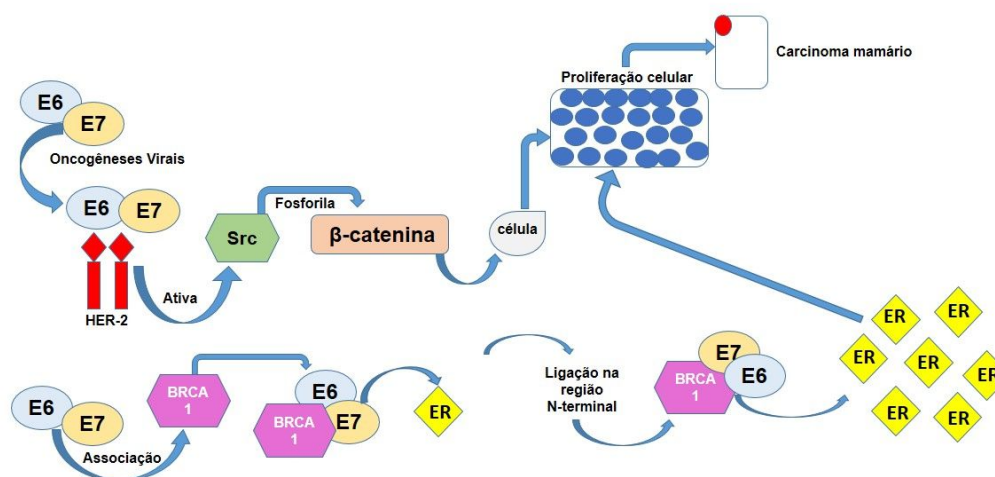


Figura 9: Diagrama esquemático mostrando as possíveis interações entre as oncoproteínas virais E6 e E7 e o receptor HER-2 e BRCA1. A. A interação entre as oncoproteínas virais E6 e E7 e o receptor HER-2 aumenta a proliferação celular. A ativação do C-src ocorre como resultado da associação entre E6 e E7 com o HER-2. C-src ativado fosforila β -catenina. A β -catenina é transposta para o núcleo das células cancerígenas e modula a transcrição celular, levando a um crescimento descontrolado das células cancerígenas da mama. B. O possível envolvimento das oncoproteínas virais E6 e E7

associadas ao BRCA1 aumenta os níveis de receptores de estrogênio α (ER- α). As mutações pontuais introduzidas por essa associação interferem na ligação à porção N-terminal BRCA1 e reduzem a capacidade de inibição de ER- α . O receptor de estrogênio (ER) estimula a divisão celular e o crescimento do tumor, após a ligação ao estrogênio em circulação. Autoria Própria

Evidências sugerem que as oncoproteínas E6 e E7 estão envolvidas na tumorigênese de câncer de mama RP-positivos através de dois mecanismos:

1) O primeiro, através da forte ligação da PR com o ErbB-2. Estudos mostram que a co-expressão do complexo E6/E7/ErbB-2 regula negativamente a expressão de caderina β -catenina, interferindo na função como um potencial regulador transcricional. Essa conversão leva à regulação positiva da ciclina D1, c- *myc* e outras oncoproteínas necessárias para a alteração do complexo E-caderina/catenina e consequentemente, a transformação celular. Entretanto, estudos mostraram que a superexpressão do receptor ErbB-2 ou a expressão do complexo E6/E7 do HPV isoladamente não afeta os padrões de expressão de caderina-E (STOCKINGER, A et al., 2001; TRABERT, B. et al., 2019);

2) O segundo, através da indução do PR na expressão gênica de ER α e ER β . Por outro lado, o estrógeno também pode modular a expressão de PR devido ao seu promotor distal possuir um elemento receptor de estrogênio (ERE), que pode se ligar a ER α e ER β , sugerindo que esses hormônios têm um ciclo de regulação positivo. Nesse sentido, foi demonstrado que o estrógeno pode regular a expressão dos oncogenes E6 e E7 uma vez que o HPV16 contém seqüências semelhantes ao ERE, na região promotora, e o receptor nuclear de estrogênio pode se ligar a esses ERE. De fato, o estrógeno aumenta a transcrição de oncogenes E6 e E7 dos HPVs de alto risco oncogênico, resultando na degradação de p53 e alterações no ciclo celular (STOCKINGER, A et al., 2001; TRABERT, B. et al., 2019);

2.2.3.4 MECANISMOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE E6/E7 E O TNBC

O TNBC representa aproximadamente 10 a 24% de todos os carcinomas mamários diagnosticados. É sabido que o TNBC é mais comum em população afrodescendente e hispânicas e em mulheres mais jovens. A progressão metastática nesse fenótipo é tipicamente precoce e tem predominância de metástase hepática, pulmonar e do sistema nervoso central. Além destas características, mais de 75% das mulheres que apresentam

mutação do gene BRCA1 tem carcinoma mamário com fenótipo TNBC (PIANA F.A; SOTGIU G; MIGLIO R.M. et al., 2014).

Como mencionado anteriormente, as mutações pontuais introduzidas por associação entre as oncoproteínas E6/E7 de HPV e BRCA1 interferem na região N-terminal de BRCA1 reduzindo a capacidade de inibição de ER- α . Altos níveis de ER circulante estimulam a divisão celular e o crescimento tumoral (YASMEEN A; LIU WENCHAO; DEKHIL HAFED et al., 2008). Estudos tem mostrado diferenças significativas da presença do DNA do HPV em TNBC quando comparados aos tumores benignos e aos tumores Luminal A e Luminal B (SCHMADEKA, R., 2014; DE CAROLIS, S. et al., 2019). Embora ainda muito limitados, estes estudos sugerem que o HPV pode ter um papel importante no processo carcinogênico dos TNBC. Apesar dessa importância, existem poucos estudos de detecção do DNA do HPV em amostras de câncer de mama no Brasil. Além disso, não existem estudos de detecção do DNA do HPV em amostras TNBC oriundas da região Nordeste do Brasil. Estudos de detecção e tipificação do HPV em tumores de mama e, mais especificamente, em TNBC de pacientes oriundas da região Nordeste do Brasil podem contribuir para: 1) determinar a prevalência do HPV em tumores de mama, uma vez que os tipos de HPV bem como a prevalência varia em diferentes regiões do mundo; (2) determinar a prevalência de HPV em TNBC; (3) analisar a prevalência do HPV na mama de mulheres oriundos do Nordeste do Brasil, cuja taxa de câncer cervical é elevada; e (4) analisar a prevalência do HPV em TNBC de pacientes oriundos do Nordeste do Brasil, onde a ascendência afrodescendente é frequente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar o DNA do Papilomavírus humano 16 (HPV16) em amostras de carcinoma mamário triplo negativo (TNBC) em pacientes oriundos do Estado da Paraíba, Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Detectar o DNA do HPV em amostras parafinadas de câncer mama Luminal A, Luminal B, HER-2- positivo e TNBC, oriundos de pacientes do Estado da Paraíba, Brasil;
- 2) Detectar o DNA do HPV16 em amostras TNBC de pacientes oriundos do Estado da Paraíba, Brasil;
- 3) Realizar um estudo de associação entre as amostras TNBC-positivo para o HPV16 e amostras TNBC-negativo para o HPV.

4 METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A pesquisa é um estudo retrospectivo experimental, realizado no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO), situado no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba – Campus I, João Pessoa.

Foram analisadas 100 (cem) amostras de tecido parafinado, com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário, cedidas pelo banco de laudos do UNILAB/ Patologia Ivan Rodrigues, situado na cidade de João Pessoa – Paraíba (**Figura 13**). As amostras de tecido mamário foram emblocadas em parafina e são procedentes de biópsias. As coletas de fragmentos de tumores das pacientes foram realizadas entre agosto de 2016 a janeiro de 2019. A idade dos pacientes variou entre 27 a 91 anos.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA VIRAL

As amostras de tecido tumoral parafinado foram submetidas à extração do DNA no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO), do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA de acordo com o método proposto por Shang-Rong Shi et al (2002), com modificações. Inicialmente, cada bloco com tecido parafinado foi submetido a 10 cortes histológicos, com cerca de 10µm de espessura. Os cortes foram adicionados a um microtubo de 2mL junto a 1 mL do Tampão de Extração (Tris/HCL 0,1M; Sacarose 0,32M; MgCl₂; Triton X-100 1%; KCl 50mM; NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%); 20µL de proteinase K (10mg/ML) e 100µL de SDS a 30%. Os microtubos com o conteúdo acima descrito foram incubados a 57°C por 48 horas em banho maria. Posteriormente, 1mL do conteúdo foi transferido para um novo microtubo e foi adicionado 1mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Nessa etapa, o conteúdo sofreu inversões por aproximadamente 2 minutos para a completa homogeneização. Foram realizadas duas etapas com solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugada a 4000rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

Para a etapa de precipitação, foi adicionado a este microtubo 1mL de álcool absoluto a 0°C e a solução deixada no *freezer overnight*. Em seguida, o microtubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 30minutos. Posteriormente, o álcool absoluto foi desprezado e o DNA é desidratado na estufa com a temperatura de 60°C. Após a secagem, adicionou-se ao DNA desidratado 200µL de água Ultrapura Milli-Q estéril.

4.3 ANÁLISE DE DETECÇÃO DO GENE ENDÓGENO HUMANO

Como controle endógeno e qualidade do DNA extraído, foram realizadas reações de qPCR nas amostras de tumores de mama, utilizando o gene TP53 que codifica para a proteína p53 do genoma humano. Para tal, foram utilizados os seguintes pares de primers: F - 5' - CCAGAATGCAAGAAGCCCAGANGGAAA-3' e R - 5'TACCAGGGCAGCYACGG TTTCCNTCTGGGCTTCTTGCAATTCTGG - 3. A PCR foi realizada contendo 200uM de desoxinucleotídeos (dCTP, dTTP e dGTP) e o didesoxinucleotídeos de interesse (ddATP), cloreto de magnésio 2,0 mM -MgCl₂, 20ng/mL de DNA, 200 pM dos iniciadores e 0,5U AmpliTaqGold (*Life Technologies- Carlsbad, CA*), com volume final de 25uL. A reação de amplificação obedeceu às seguintes condições: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 60 ciclos de 20 segundos a 95°C, anelamento de 30 segundos a 55°C, seguido por 20 segundos a 72°C de extensão e extensão final de 2 minutos a 72°C. A determinação e análise da curva de *melting* (T_m) foi realizada com mistura de *SYBR Green 2x* e *Rox 1x* (*Life Technologies – Carlsbad, CA*), no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (*Life Technologies – Carlsbad, CA*), seguindo as condições de pré-aquecimento, a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 45°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 5 minutos.

4.4 DETECÇÃO DO DNA VIRAL

A detecção do DNA viral foi realizada através da amplificação de uma sequência conservada do gene L1, utilizando os primers GP05/06. Esse conjunto de *primer* pode amplificar um fragmento de L1 de cerca 25 tipos de HPVs (de Roda Husman et al., 1995). Como controle positivo, foi utilizado alíquotas do genoma completo de HPV16, clonado no vetor pBR-322. Em todas as reações, foi utilizado o aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (*Life Technologies – Carlsbad, CA*).

A condições de amplificação da amplificação do gene L1, usando os primers GP05/06 foram as seguintes: Volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL Taq Pol Master Mix 2x (Cellco); 0,1 µL do primer R (50nmol); 0,1 µL do primer F (50nmol); 10,3 µ de água ultrapura Milli-Q estéril e 2 µL de DNA (100ng/ µl). As condições de amplificação do gene L1 foram as seguintes: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, anelamento de 1 minuto a 45°C, seguido por 1 minuto a 72°C de extensão e 10 minutos a 72°C de extensão final 2 minutos. A análise da curva de *melting* (T_m) foi realizada

com mistura de *SYBR Green 2x* e *Rox 1x* (Life Technologies – Carlsbad, CA), no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies – Carlsbad, CA), seguindo as condições de pré-aquecimento, a partir de 25°C a 95°C durante 1 minuto, dobrando até 45°C para 5 minutos, e um aquecimento gradual (1°C por minuto) até a temperatura de 95°C durante 5 minutos.

Tabela 4: Primers usados para detecção do DNA do HPV.

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO (pb)	REFERÊNCIA
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	110pb	De Roda Husman et al., 1995
GP6	GAAAAATAAACTGTAAATCA	110pb	De Roda Husman et al., 1996

4.5 TIPIFICAÇÃO DO DNA VIRAL

Para a tipificação, foi utilizado um conjunto de *primers* específicos que amplificam regiões de E6 de HPV16. Em todas as reações, foi utilizado o aparelho 7500 *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies – Carlsbad, CA). Os parâmetros utilizados para a amplificação do gene E6 foram: Volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL Taq Pol Master Mix 2x (Cellco); 0,1 µL do primer R (50nmol); 0,1 µL do primer F (50nmol); 10,3 µ de água ultrapura Milli-Q estéril e 2 µL de DNA (100ng/ µl). As condições da PCR foram 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 50 ciclos com duas etapas de 15 segundos a 95°C, e 1 minuto a 61°C (adaptado de Peitsaro et al., 2002). Como controle foram utilizadas diluições do genoma completo de HPV 16 clonado no vetor pBR-322.

Tabela 5: Primer do gene E6 utilizado para tipificação do DNA do HPV 16.

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO (pb)	REFERÊNCIA
E6 (HPV 16)	GAGAAACTGCAATGTTTCAGGACC (senso)	81pb	De Roda Husman et al., 1995
E6 (HPV 16)	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC (antisenso)	81pb	Peitsaro et al., 2002

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram realizadas análises estatísticas para avaliar a frequência de HPV em relação as características clínico-patológicas na população estudada. Para tal, foi utilizado o teste Exato

de *Fisher*. *P-value* menor que 0,05 ($p < 0,05$) foi considerado significativo.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS:

O presente estudo atende às resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, o presente estudo faz parte do projeto temático aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba CCM-UFPB, sob o código CAAE: 08697219.7.0000.8069 e pela IFPB, sob o código CAAE: 41334720.1.0000.5185.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram analisados 100 (cem) amostras de tecido parafinado, oriundo de um banco de amostras do laboratório UNILAB/ João Pessoa – PB. Todas as amostras analisadas foram coletadas de pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de mama invasivo (CI) sem outras especificações (SOE). Todos os indivíduos desse estudo foram do sexo feminino, com a média de idade de 58,47 anos (27 a 91 anos). Foi observado uma predominância de casos de CI na faixa etária superior aos 50 anos (45% do total da amostra estudada).

As amostras de CM também foram categorizadas de acordo com a classificação molecular, a localização anatômica do tumor e o grau histológico. Com relação à localização do tumor, foi observado uma predominância da mama direita (54%) quando comparada à mama esquerda (46%). 52% do total da amostra estudada apresentava grau II de estadiamento. Os subtipos luminais A e B (40% e 24%, respectivamente) foram os mais frequentes, seguido pelo TNBC (15%).

Tabela 6 – Caracterização das amostras de CM em relação a idade, localização anatômica, grau histológico e classificação molecular.

Variável		Total de casos (%)
Idade	20-50	38
	51-70	45
	>70	17
Localização anatômica	Mama esquerda	46
	Mama direita	54
Grau histológico	I	15
	II	52
	III	33
Classificação molecular	Luminal A	40
	Luminal B	24
	Luminal híbrido	12
	Triplo Negativo (TNBC)	15
	HER-2+	09

Luminal A = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 < 14%; Luminal B = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 ≥14%; Luminal HÍBRIDO = RE+ e/ou RP+ ; HER2 +; GRUPO HER2 = RE- e RP- ; HER2 +; BASAL-LIKE = Triplo negativo (RE- RP- HER2 -) e CK 5/6 + e/ou EGFR +; Grau Histológico: I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pouco diferenciado).

5.2 ANÁLISE DA DETECÇÃO DO GENE ENDÓGENO HUMANO

Para analisar a qualidade do DNA das amostras, foram realizadas qPCRs que amplificam o gene p53. Todas as amostras incluídas no estudo foram positivas para a p53, indicando que o DNA estava disponível para a detecção e tipificação do HPV (**Figura 11**).

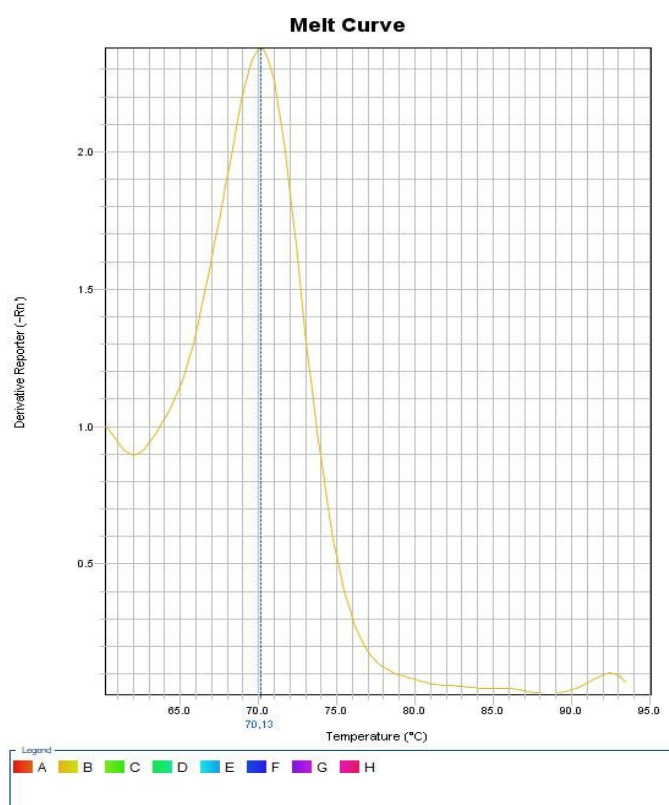


Figura 10: Curva de *Melting* do genótipo p53

Fonte: Equipamento 7500 Fast Real-time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA).

5.3 DETECÇÃO E TIPIFICAÇÃO DO DNA DO HPV

Após a análise da qualidade do DNA das amostras, foram realizados os estudos de detecção do HPV das amostras utilizando os primers degenerados GP5/GP6, que amplifica um fragmento de aproximadamente 150 pb da região L1. Todas as amostras GP5/GP6 positivas foram submetidas à tipagem em reação tipo qPCR, com os primers da região consenso E6 do HPV16, conforme descrito anteriormente (Peitsaro et al., 2002; De Roda Husman et al., 1995). Os resultados mostraram a presença do DNA do HPV em 60% (60/100) dos espécimes do câncer de mama do tipo invasivo sem outra especificação (SOE). Além disso, também foi observada a presença do DNA do HPV16 em 60% (60/100) das amostras de CM (**Figura 11 e 12**). Dessa forma, foi observado que 100% das amostras positivas para

o DNA do HPV foram positivas para o HPV16.

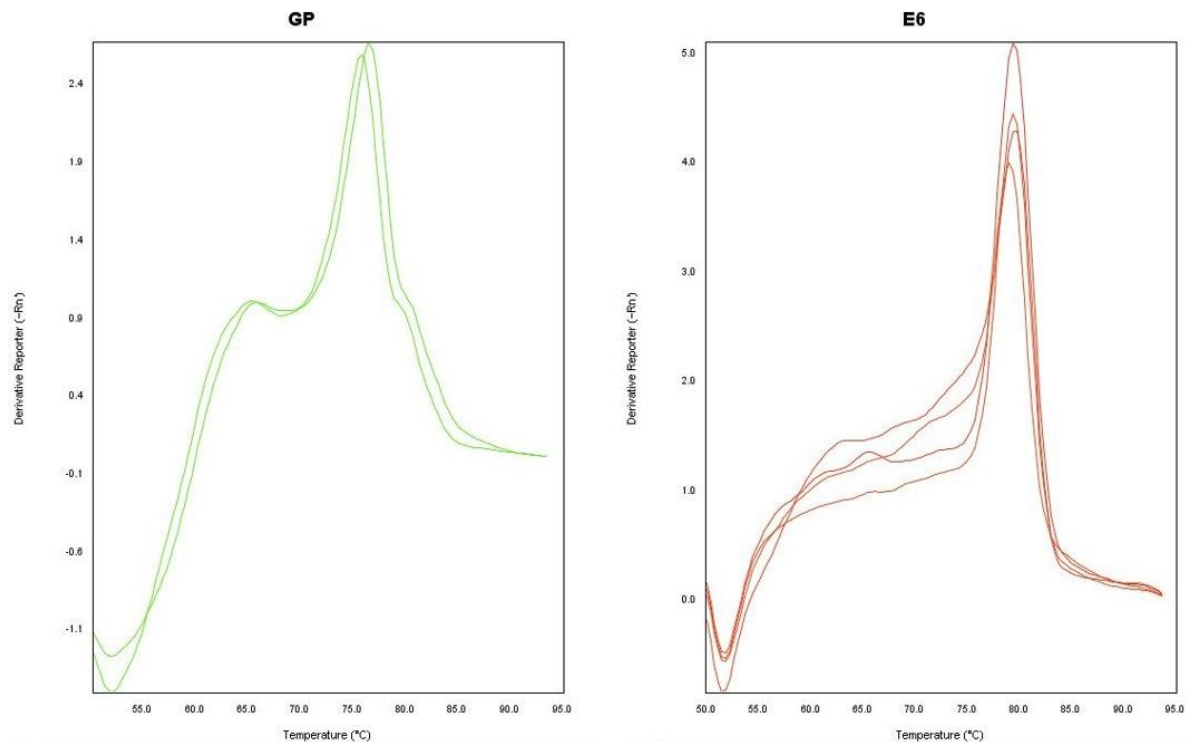


Figura 11: **A)** Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando a Tm do primer GP5/GP6. A figura mostra a Tm da amostra de CM amplificado com os primers GP5/GP6. A Tm da amostra de CM é de 81,13°C. **B)** Representação gráfica obtida por Real Time- PCR mostrando a Tm do primer E6. A figura mostra a Tm da amostra de CM amplificado com o primer E6. A Tm da amostra de CM é de 78,91°C.

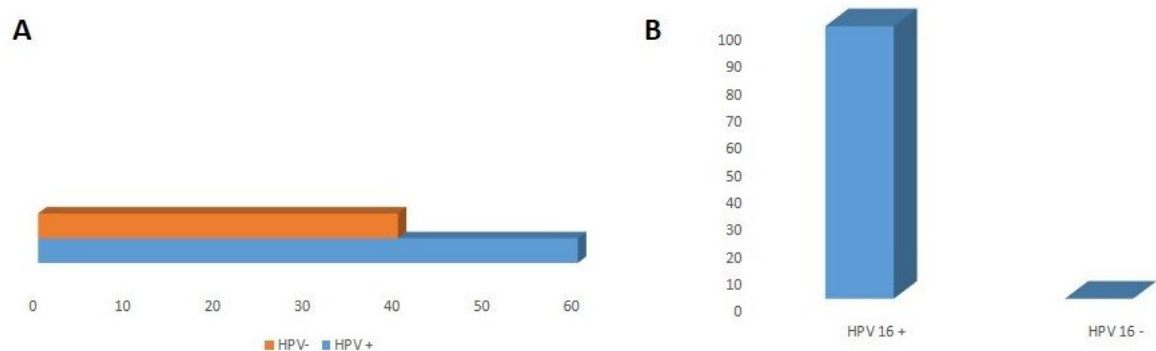


Figura 12– Frequência e tipificação do DNA viral.

Frequência e tipificação do DNA viral. A) O DNA do HPV foi detectado em 60% das 100 amostras. B) O tipo do HPV encontrado nas amostras de CM foi 100% (100/100) do HPV 16.

A presença do DNA do HPV na faixa etária acima de 70 anos foi detectada em 70,58% (12/17) das amostras, seguido da faixa etária de 27 a 50 anos, com positividade de 52,63% (23/45) e a faixa etária 51 a 70 anos, com positividade de 51,11% (20/38). Com relação a

localização patológica do tumor, a mama direita apresentou um percentual de 60,36% (32/54) amostras positivas para a presença do DNA do HPV em comparação da mama esquerda, com positividade de 59,25% (28/46). Também foi avaliado o grau histológico, no qual o DNA do HPV foi encontrado nas amostras CM grau 3 a positividade do HPV de 66,66% (22/33), seguido do Grau 2 com 63,46% (33/52) e o Grau 1, com 26,66% (4/14). Além disso, foram observadas diferenças significativas ($p=0,02$) entre a presença do DNA do HPV e o grau histológico do câncer de mama (Tabela 7), sendo mais frequente a presença do HPV nos graus II e III quando comparados com o grau I.

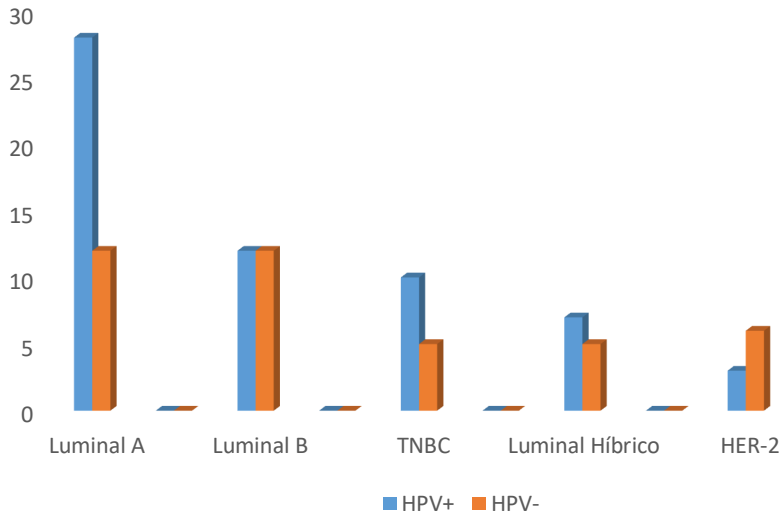


Figura 13: Frequência do HPV de acordo com a classificação molecular do CM. O subtipo luminal A apresentou um percentual de 70% (28/40) de amostras positivas para o HPV, seguido de do TNBC (66,66% ,10/15), luminal híbrido (58,33% ,7/12), luminal B (50%, 12/24) e HER-2 (33,33%, 3/9).

O DNA do HPV também foi avaliado de acordo com a classificação molecular dos tumores de mama. O subtipo luminal A apresentou um percentual de 70% (28/40) de amostras positivas para o HPV, seguido de do TNBC (66,66% ,10/15), luminal híbrido (58,33% ,7/12), luminal B (50%, 12/24) e HER-2 (33,33%, 3/9).

Variável		Total de casos (%)	HPV 16 +	HPV 16 -	p-value
Idade	20-50	38	20	18	0.3681
	51-70	45	23	22	
	>70	17	12	5	
Localização anatômica	Mama esquerda	46	28	18	1
	Mama direita	54	32	22	
	I	15	4	11	

Grau histológico	II	52	33	19	0.02433
	III	33	22	11	
Classificação molecular	Luminal A	40	28	12	0.2359
	Luminal B	24	12	12	
	Luminal híbrido	12	7	5	
	Triplo Negativo (TNBC)	15	10	5	
	HER-2+	09	3	6	

Tabela 7: Presença do DNA do HPV de acordo com a idade, localização anatômica, grau histológico e classificação molecular dos tumores.

5.4 ASSOCIAÇÃO DO CARCINOMA MAMÁRIO TNBC COM O HPV 16

Nosso estudo realizou a associação do tipo caso-controle das amostras TNBC com o HPV 16. Das 15 amostras TNBC, foi detectado a presença do HPV16 em 10 amostras (67%). Entretanto, não houve diferenças significativas entre os grupos TNVC positivo e negativo para o DNA do HPV (Tabela 8). Apenas 5 amostras (33%) TNBC não foram detectadas a presença do DNA viral.

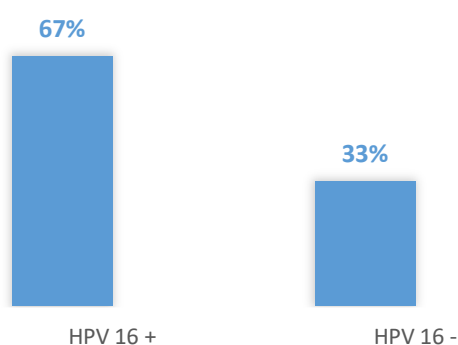


Figura 15 : Frequência do HPV 16 nas amostras do carcinoma mamário TNBC.

Além disso, foi detectado que as mulheres com idade de 20 a 50 anos apresentaram uma positividade de 71,42% (5/7) para o HPV nas amostras TNBC, na faixa etária de 51 a 70 a positividade foi de 62,5% (5/8). Não detectamos TNBC em mulheres com idade superior a 70 anos. Também, foi visto que a localização anatômica do tumor foi predominante na mama direita 80% (8/10) e a mama esquerda menos frequente 10% (2/10). Com relação ao grau histológico, o grau do tipo 2 apresentaram positividade de 83,33% (5/6) e o grau 3 apresentaram positividade de 55,55% (5/9). Não foram detectadas amostras TNBC grau 1 positivas para o HPV.

Tabela 8: Relação entre a presença do DNA viral e os dados de localização, faixa etária e subtipos moleculares das pacientes TNBC.

	Variável	Total de casos (%)	HPV+	HPV-	p-value
Idade	20-50	7	5	2	0.5921
	51-70	8	5	3	
	>70	0	0	0	
Localização anatômica	Mama	4	2	2	0.2507
	esquerda	11	8	3	
	Mama direita				
Grau histológico	I	0	0	0	0.5804
	II	6	5	1	
	III	9	5	4	

6. DISCUSSÃO

Este estudo encontrou uma elevada positividade para o HPV através da técnica de qPCR nas amostras de carcinoma mamário. As amostras realizadas no presente estudo foram do câncer de mama invasivo sem outra especificação (SOE), também conhecido como carcinoma ductal invasivo. O DNA viral foi detectado pela primeira vez na Paraíba apresentando positividade em 60% das amostras, indicando uma possível correlação do vírus com a carcinogênese mamária. Identificamos o genótipo do HPV 16 alto risco nas amostras de CM, no que permitiu a detecção da co-infecção por HR-HPV em 100% (60/60).

Os resultados do presente estudo estão em concordância com estudos anteriores em várias regiões do mundo, que também relataram estudos similares dos casos positivos (ACETO et al., 2010; AGUAYO et al., 2011b; AKIL et al., 2008; ANTONSSON et al., 2011a; BALTZELL et al., 2012; BRATTHAUER; TAVASSOLI; O'LEARY, 1992; CAROLIS et al., 2017; CHANG et al., 2012; CHOI et al., 2016, 2007; DE CAROLIS et al., 2019; DE VILLIERS et al., 2004; DELGADO-GARCÍA et al., 2017; FERNANDES et al., 2015; GANNON et al., 2015; GLENN; WHITAKER; LAWSON, 2012; HAGHSHENAS et al., 2016; HENNIG et al., 1999; HERRERA-GOEPFERT et al., 2013; HESKE; MENDENHALL; KINGSLEY, 2019; ISLAM et al., 2018; KHAN et al., 2008; LAWSON et al., 2009; LI; DING; ZHAI, 2015; LI et al., 2011; MENDIZABAL-RUIZ et al., 2009; MOU et al., 2011; NAUSHAD; SURRIYA; SADIA, 2017; NGAN et al., 2015; ONG; KOAY; PUTTI, 2009; PEREIRA SUAREZ et al., 2013; PIANA et al., 2014; SALMAN et al., 2017; SILVA; DA SILVA, 2011a, 2011b; SIMÕES et al., 2012; TSAI et al., 2005; VERNET-TOMAS et al., 2015; WANG et al., 2016, 2014; WOODS IGNATOSKI et al., 2005; ZAPATKA et al., 2020). Porém, o resultado do nosso estudo foi superior do identificado em um estudo descritos de uma metanálise com 29 estudos publicados, no qual, a prevalência do HPV em pacientes com câncer de mama variou de 13,4% a 42,9% (SIMÕES, P. W., 2012).

No presente estudo, distribuição do DNA do HPV 16 nos três grupos etários foi a seguinte: faixa etária acima de 70 anos (70,58% (12/17) das amostras; A faixa etária de 27 a 50 anos, apresentou positividade Estes resultados indicam a possibilidade de uma associação significativa entre o carcinoma mamário - HPV positivo e o avanço da idade. De acordo com KOLODZIEJANDREJUK et al., 2013 mostrou um resultado similar ao do presente estudo demonstrando uma correlação direta entre a presença do DNA do HPV no carcinoma mamário com o aumento da idade das pacientes. Mas, de fato, um maior número de estudos tem encontrado maior frequência de detecção do DNA do HPV no carcinoma mamário em mulher jovem e relacionaram às atividades sexuais mais frequentes neste grupo (KROUPIS et al., 2006; LAWSON et al., 2006; AKIL et al., 2008; GLENN et al., 2012; ISLAM et al., 2017;

LAWSON; SALMONS; GLENN, 2018). Além disso, a segunda maior prevalência, neste estudo, de CM - HPV positivos em mulher com idade abaixo de 50 anos poderia ser explicada pela modulação da carcinogênese pelos hormônios femininos. O HPV tem elementos responsivos aos hormônios na região longa de controle (*Long Control Region* - LCR) que parecem estar associados a uma replicação aumentada dos vírus, neste caso, ocorre um aumento das proteínas E6 e E7 do HPV na presença destes hormônios esteroides (ILAHÍ et al., 2016).

Também avaliamos a localização patológica do tumor e o grau histológico, a mama direita apresentou um percentual de 60,36% (32/54) amostras positivas para a presença do DNA do HPV em comparação da mama esquerda, com positividade de 59,25% (28/46). Esse resultado discorda com os estudos da literatura, que mostram a predominância do câncer de mama na mama esquerda, a mama esquerda tem 5 a 10% mais chances de desenvolver câncer do que a mama direita. O lado esquerdo do corpo também é cerca de 5% mais propenso ao melanoma. Ninguém sabe exatamente por que isso acontece (AMER, M. H et al., 2014).

Com relação ao grau histológico, o DNA do HPV foi encontrado nas amostras CM grau 3 a positividade do HPV de 66,66% (22/33), seguido do Grau 2 com 63,46% (33/52) e o Grau 1, com 26,66% (4/14) ($p=0,02$). De acordo com EMAD A.R et al., (2010) os cânceres HER2-positivos e triplo-negativos a maioria desses tumores é de alto grau. Este resultado sugere que as taxas de prevalência crescentes para a gravidade do CM, apresentam maior positividade para o HPV.

De acordo com a classificação molecular, a presença do DNA do HPV no subtipo luminal A apresentou um percentual de 70% (28/40) de amostras positivas para o HPV, similar ao estudo realizado na Venezuela, no qual o Luminal A apresentou uma maior predominância. A predominância do HPV nas amostras CM do tipo TNBC (66,66% ,10/15) também mostraram positividade elevada, o que entra em consonância ao estudo realizado na Itália que encontrou alta predominância do vírus nas amostras TNBC (variou de 15 a 50%). Além disso, nesse estudo, a detecção do HPV nas amostras CM do tipo luminal híbrido (58,33% ,7/12), luminal B (50%, 12/24) e HER-2 (33,33%, 3/9), apresentaram uma menor predominância em comparação ao Luminal A e TNBC (SUGHRUE, T. et al., 2014; FERNANDES, A. et al., 2015; STENSEN, S. et al., 2016; YAO, HUI et al., 2017; ANDERSEN, B. et al., 2019; DE CAROLIS, S. et al., 2019).

A presença o HPV no tecido mamário ainda é controverso. Entre as possíveis hipóteses para essa controversia, é (i) dificuldades na detecção devido à baixa carga viral e baixa frequência de HPV nos cânceres de mama em algumas populações; (ii) diferenças entre amostras frescas e amostras embebidas em parafina; (iii) diferenças nos métodos de

detecção (a sensibilidade dos métodos utilizados, como o uso de diferentes conjuntos de iniciadores); (iv) diferentes tipos histológicos de tumores da mama. A carga viral do HPV pode ser muito baixa no tecido mamário em comparação com o tecido do câncer cervical, devido o tecido mamário não ser o sítio específico do vírus; e a preparação da amostra, o isolamento do DNA e a amplificação pela técnica PCR podem introduzir contaminação. Todos esses fatores foram indicados como agente inibitórios que podem afetar as taxas de detecção do HPV (HENG et al., 2009; WANG, YA-WEN et al., 2017).

O presente estudo realizou a detecção do DNA do HPV em amostras TNBC. A presença do DNA do HPV 16 foi detectada em 67% (10/15 amostras. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre TNBC positivo e negativo para o DNA do HPV. Mesmo não apresentando diferenças estatísticas, a presença do DNA do HPV em TNBC foi superior ao estudo encontrado na Itália, que a discrepância pode ser devido ao baixo número de amostras (PIANA, A. F. et al., 2014). A faixa etária de 20 a 50 anos apresentaram uma positividade de 71,42% (5/7) para o HPV nas amostras TNBC, na faixa etária de 51 a 70 a positividade foi de 62,5% (5/8). Não detectamos TNBC em mulheres com idade superior a 70 anos. Esse resultado é similar ao encontrado na Inglaterra, que identificou a presença dos TNBC em amostras inferiores a 40 anos. Nossa hipótese é de que a prevalência do HPV na faixa etária jovem é alta devido ao início da atividade sexual e o o número de parceiros sexuais, relacionados, assim, à maior exposição ao HPV. Além disso, o uso de contraceptivos orais está associado à progressão da infecção pelo HPV para o câncer. Por exemplo, o uso de contraceptivos pode contribuir para o aumento da exposição sexual em mulheres e pode aumentar o risco de infecções pelo vírus (MONTALVO, M. T. et al., 2011).

Assim, apesar do câncer de mama ser um grave problema de saúde pública, sua etiologia não é bem esclarecida. O HPV tem sido proposto como um dos fatores para a progressão tumoral. Nosso estudo mostrou que 60% dos tumores de mama avaliados apresentaram positividade para o DNA do HPV. Também demonstramos a presença do DNA do HPV em 67% dos TNBC. Apesar disso, estes dados não foram significativos quando comparados aos TNBC negativos para o HPV. Também foi mostrado, nesse estudo, que a presença do DNA do HPV é mais frequente em graus histológicos mais avançados do câncer de mama. Dessa maneira, com o avanço das pesquisas, haverá a possibilidade de uma melhor compreensão do papel do HPV no desenvolvimento e estadiamento do câncer de mama, permitindo a estratificação dos casos, implantação de medidas que reduzam o impacto da doença e o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento com a consequentemente a prevenção do carcinoma mamário.

7. CONCLUSÃO

- Foi detectado pela primeira vez no Estado da Paraíba, Brasil, a presença do DNA do HPV nas amostras de câncer de mama. A taxa de detecção viral encontrada no nosso estudo foi de 60% no tecido mamário maligno;
- O DNA do HPV 16 foi detectado em 100% (60/60) amostras CM positivas para o HPV;
- A presença do DNA do HPV foi significativamente mais frequente em graus histológicos II e III quando comparados com grau I;
- O DNA do HPV foi encontrado em 67% dos TNBC. Contudo, estes dados não foram significativos quando comparados aos TNBC negativos para o DNA do HPV;
-

8. REFERÊNCIAS

- ACETO, G. M. et al. High-risk human papilloma virus infection, tumor pathophenotypes, and BRCA1/2 and TP53 status in juvenile breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, n. 3, p. 671–683, 1 ago. 2010.
- AGUAYO, F. et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from chile. **Infectious Agents and Cancer**, v. 6, n. 1, p. 7, 2011a.
- AGUAYO, F. et al. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from chile. **Infectious Agents and Cancer**, v. 6, n. 1, p. 7, 23 jun. 2011b.
- AKIL, N. et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 3, p. 404–407, ago. 2008.
- AL MOUSTAFA, A.-E. et al. E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. **Oncogene**, v. 23, n. 2, p. 350–358, 15 jan. 2004.
- AL MOUSTAFA, A.-E. et al. High-risk HPV/ErbB-2 interaction on E-cadherin/catenin regulation in human carcinogenesis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 22, p. 2159–2172, 2008.
- ALIBEK, K. et al. Role of viruses in the development of breast cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n. 1, p. 32, 2 set. 2013.
- ANDERS, C. K. et al. Breast Cancer Before Age 40 Years. **Seminars in Oncology**, Impact of Malignant Disease on Young Adults. v. 36, n. 3, p. 237–249, 1 jun. 2009.
- ANTONSSON, A. et al. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 12, p. 2157–2163, 2011a.
- ANTONSSON, A. et al. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 12, p. 2157–2163, dez. 2011b.
- ARTHUR, R. S. et al. Genetic factors, adherence to healthy lifestyle behavior, and risk of invasive breast cancer among women in the UK Biobank. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [s.d.].
- BALTZELL, K. et al. Limited evidence of human papillomavirus on breast tissue using molecular in situ methods. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1212–1220, 2012.
- BALTZELL, K. A. et al. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. **Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1342–1349, 2018.
- BERNARD, H.-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan**

American Society for Clinical Virology, v. 32 Suppl 1, p. S1-6, mar. 2005.

BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 25 maio 2010.

BERNARD, H.-U. Taxonomy and phylogeny of papillomaviruses: An overview and recent developments. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 18, p. 357–361, ago. 2013a.

BERNARD, H.-U. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 197–204, out. 2013b.

BISHOP, B.; DASGUPTA, J.; CHEN, X. S. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. **Virology Journal**, v. 4, n. 1, p. 3, 8 jan. 2007.

BRATTHAUER, G. L.; TAVASSOLI, F. A.; O'LEARY, T. J. Etiology of Breast Carcinoma: No Apparent Role for Papillomavirus Types 6/11/16/18. **Pathology - Research and Practice**, v. 188, n. 3, p. 384–386, 1 abr. 1992.

BUEHRING, G. C. et al. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0134304, 2 set. 2015.

CAROLIS, S. D. et al. Liquid biopsy in the diagnosis of HPV DNA in breast lesions. **Future Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 187–194, 4 out. 2017.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 6, 1 jun. 2016.

CAZZANIGA, M. et al. Analysis of the presence of cutaneous and mucosal papillomavirus types in ductal lavage fluid, milk and colostrum to evaluate its role in breast carcinogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 114, n. 3, p. 599, 9 maio 2008.

CHANG, P. et al. Absence of human papillomavirus in patients with breast cancer in north-west China. **Medical Oncology**, v. 29, n. 2, p. 521–525, 1 jun. 2012.

CHEN, Y. et al. Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 2155–2186, 22 out. 2014.

CHEN, Z. et al. Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20183, 27 maio 2011.

CHENG, Y.-W. et al. Human papillomavirus 16/18 E6 oncoprotein is expressed in lung cancer and related with p53 inactivation. **Cancer research**, v. 67, n. 22, p. 10686–10693, 15 nov. 2007.

CHOI, J. et al. Detection of Human Papillomavirus in Korean Breast Cancer Patients by Real-Time Polymerase Chain Reaction and Meta-Analysis of Human Papillomavirus and Breast Cancer. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 50, n. 6, p. 442–450, nov. 2016.

CHOI, Y.-L. et al. Detection of Human Papillomavirus DNA by DNA Chip in Breast Carcinomas of Korean Women. **Tumor Biology**, v. 28, n. 6, p. 327–332, 2007.

CORNET, I. et al. Human Papillomavirus Type 16 Genetic Variants: Phylogeny and Classification Based on E6 and LCR. **Journal of Virology**, v. 86, n. 12, p. 6855–6861, jun. 2012.

DE CAROLIS, S. et al. HPV DNA Associates With Breast Cancer Malignancy and It Is Transferred to Breast Cancer Stromal Cells by Extracellular Vesicles. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2019.

DE FREITAS, A. C. et al. Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 12, p. 2415–2427, 1 dez. 2016.

DE OLIVEIRA, T. H. A. et al. Presence and activity of HPV in primary lung cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2367–2376, 1 dez. 2018.

DE SANJOSÉ, S. et al. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. **JNCI Cancer Spectrum**, v. 2, n. 4, 7 jan. 2019.

DE VILLIERS, E.-M. et al. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 1, p. R1, 22 out. 2004.

DELGADO-GARCÍA, S. et al. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 320, 8 maio 2017.

DI LONARDO, A.; VENUTI, A.; MARCANTE, M. L. Human papillomavirus in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 21, n. 2, p. 95–100, 1992.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 7–15, mar. 2005.

DOORBAR, J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 297–313, 2007.

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 80–98, out. 2013.

DOORBAR, J. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. S1, p. 2–23, 2015.

DOORSLAER, K. V. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. 2018. **Emerging Oncogenic Viruses 2016**. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/oncogenicviruses2016/en/Background>>. Acesso em: 17 set. 2018.

FERNANDES, A. et al. Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. **ecancermedicalscience**, v. 9, 25 jun. 2015.

GANNON, O. M. et al. No association between HPV positive breast cancer and expression of human papilloma viral transcripts. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–8, 14 dez. 2015.

GLENN, W. K. et al. Epstein-Barr Virus, Human Papillomavirus and Mouse Mammary Tumour Virus as Multiple Viruses in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48788, 19 nov. 2012a.

GLENN, W. K. et al. Epstein-Barr Virus, Human Papillomavirus and Mouse Mammary Tumour Virus as Multiple Viruses in Breast Cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 19 nov. 2012b.

GLENN, W. K.; WHITAKER, N. J.; LAWSON, J. S. High risk human papillomavirus and Epstein Barr virus in human breast milk. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 477, 1 set. 2012.

GUMUS, M. et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 25, n. 4, p. 515–521, dez. 2006.

HAGHSHENAS, M. R. et al. Human papillomavirus and breast cancer in Iran: a meta-analysis. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 19, n. 3, p. 231–237, mar. 2016.

HENG, B. et al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1345–1350, 1 set. 2009.

HENNIG, E. M. et al. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 53, n. 2, p. 121–135, 1 jan. 1999.

HERRERA-GOEPFERT, R. et al. High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. **BMC Cancer**, v. 13, n. 1, p. 445, 1 out. 2013.

HESKE, M. L.; MENDENHALL, T.; KINGSLEY, K. HPV-16 and HPV-18 Affects Viability and Proliferation in Normal Breast Tissue Cells. **International Research Journal of Oncology**, p. 1–9, 4 out. 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018**, 2018.

ISLAM, S. et al. Phylogenetic analysis of Human papillomavirus 16 variants isolated from Indian Breast cancer patients showed difference in genetic diversity with that of cervical cancer isolates. **Virus Research**, v. 243, p. 1–9, 2 jan. 2018.

KHAN, N. A. et al. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 3, p. 408–414, ago. 2008.

KLEIN, F.; AMIN KOTB, W. F. M.; PETERSEN, I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 65, n. 1, p. 13–18, jul. 2009.
KLUTHCOVSKY, A. C. G. C. et al. Female breast cancer mortality in Brazil and its regions. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 60, n. 4, p. 387–393, 2014.

KROUPIS, C. et al. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 727–731, jul. 2006.

LAWSON, J. S. et al. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1351–1356, out. 2009.

LEE, A. J. et al. Incorporating Truncating Variants in PALB2, CHEK2 and ATM into the

BOADICEA Breast Cancer Risk Model. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 18, n. 12, p. 1190–1198, dez. 2016.

LI, J.; DING, J.; ZHAI, K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 21 ago. 2015.

LI, N. et al. Human papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 126, n. 2, p. 515–520, 1 abr. 2011.

LIAO, J. B. Viruses and Human Cancer. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 79, n. 3–4, p. 115–122, dez. 2006.

LICHTENSTEIN, P. et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 2, p. 78–85, 13 jul. 2000.

MACK, T. M. et al. Heritable breast cancer in twins. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 3, p. 294–300, jul. 2002.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 57–79, out. 2013.

MENDIZABAL-RUIZ, A. P. et al. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 114, n. 1, p. 189–194, 1 mar. 2009.

MICHAILIDOU, K. et al. Genome-wide association analysis of more than 120,000 individuals identifies 15 new susceptibility loci for breast cancer. **Nature Genetics**, v. 47, n. 4, p. 373–380, abr. 2015.

MORALES-SÁNCHEZ, A.; FUENTES-PANANÁ, E. M. Human Viruses and Cancer. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 4047–4079, 23 out. 2014.

MOU, X. et al. Low Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Chinese Patients with Breast Cancer. **Journal of International Medical Research**, v. 39, n. 5, p. 1636–1644, 1 out. 2011.

NAUSHAD, W.; SURRIYA, O.; SADIA, H. Prevalence of EBV, HPV and MMTV in Pakistani breast cancer patients: A possible etiological role of viruses in breast cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 230–237, 1 out. 2017.

NGAN, C. et al. Early Human Papilloma Virus (HPV) Oncogenic Influences in Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 9, p. BCBCR.S35692, 1 jan. 2015.

ONG, K.; KOAY, E. S.-C.; PUTTI, T. C. Detection of cutaneous HPV types 4 and 24 DNA sequences in breast carcinoma in Singaporean women of Asian ancestry. **Pathology**, v. 41, n. 5, p. 436–442, 1 jan. 2009.

PARSONS, M. T. et al. Large scale multifactorial likelihood quantitative analysis of BRCA1 and BRCA2 variants: An ENIGMA resource to support clinical variant classification. **Human Mutation**, v. 40, n. 9, p. 1557–1578, 2019.

PEREIRA SUAREZ, A. L. et al. Presence of Human Papilloma Virus in a Series of Breast Carcinoma from Argentina. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 25 abr. 2013.

PIANA, A. F. et al. HPV infection and triple-negative breast cancers: an Italian case-control study. **Virology Journal**, v. 11, n. 1, p. 190, 21 nov. 2014.

PIKE, M. C. et al. 'Hormonal' risk factors, 'breast tissue age' and the age-incidence of breast cancer. **Nature**, v. 303, n. 5920, p. 767–770, jun. 1983.

REIS-FILHO, J. S.; PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet (London, England)**, v. 378, n. 9805, p. 1812–1823, 19 nov. 2011.

RUDER, E. H. et al. Examining Breast Cancer Growth and Lifestyle Risk Factors: Early Life, Childhood, and Adolescence. **Clinical Breast Cancer**, v. 8, n. 4, p. 334–342, 1 ago. 2008.

SALMAN, N. A. et al. Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: A UK based Study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 27 fev. 2017.

SCHMIDT, M.; KEDZIA, W.; GOŹDZICKA-JÓZEFIK, A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 23, n. 1–2, p. 65–77, dez. 2001.

SILVA, R. G.; DA SILVA, B. B. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 1, p. 261–264, 1 jan. 2011a.

SILVA, R. G.; DA SILVA, B. B. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 1, p. 261–264, 1 jan. 2011b.

SIMÕES, P. W. et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Breast Cancer: A Systematic Review. **International Journal of Gynecologic Cancer**, v. 22, n. 3, p. 343–347, 1 mar. 2012.

SINN, H.-P.; KREIPE, H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care**, v. 8, n. 2, p. 149–154, maio 2013.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. **Vaccine**, v. 24 Suppl 1, p. S16–22, 30 mar. 2006.

STANLEY, M. Prophylactic human papillomavirus vaccines: will they do their job? **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 3, p. 251–259, 1 mar. 2010.

SYRJANEN, K. J. HPV infections and lung cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 12, p. 885–891, dez. 2002.

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **Journal of Clinical Virology**, Supplement: Human Papillomaviruses. v. 32, p. 59–66, 1 mar. 2005.

TRICHOPOULOS, D.; MACMAHON, B.; COLE, P. Menopause and Breast Cancer Risk. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 48, n. 3, p. 605–613, 1 mar. 1972.

TSAL, J.-H. et al. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. **Journal of**

Medical Virology, v. 75, n. 2, p. 276–281, 2005.

VERNET-TOMAS, M. et al. Human Papillomavirus and Breast Cancer: No Evidence of Association in a Spanish Set of Cases. **Anticancer Research**, v. 35, n. 2, p. 851–856, 2 jan. 2015.

WANG, D. et al. Presence of high risk HPV DNA but indolent transcription of E6/E7 oncogenes in invasive ductal carcinoma of breast. **Pathology - Research and Practice**, v. 212, n. 12, p. 1151–1156, 1 dez. 2016.

WANG, T. et al. Detection and Analysis of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Breast Cancer Patients by an Effective Method of HPV Capture. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 10 mar. 2014.

WANG, Y. et al. Detection of Mammary Tumor Virus ENV Gene-like Sequences in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 55, n. 22, p. 5173–5179, 15 nov. 1995.

WIDSCHWENDTER, A. et al. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 31, n. 4, p. 292–297, dez. 2004a.

WIDSCHWENDTER, A. et al. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n. 4, p. 292–297, 1 dez. 2004b.

WILCZYNSKI, S. P. et al. Human papillomavirus type 6 in squamous cell carcinoma of the bladder and cervix. **Human Pathology**, v. 24, n. 1, p. 96–102, 1 jan. 1993.

WOODS IGNATOSKI, K. M. et al. Cooperative Interactions of HER-2 and HPV-16 Oncoproteins in the Malignant Transformation of Human Mammary Epithelial Cells. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 7, n. 8, p. 788–798, ago. 2005.

YASMEEN, A. et al. ErbB-2 Receptor Cooperates with E6/E7 Oncoproteins of HPV Type 16 in Breast Tumorigenesis. **Cell Cycle**, v. 6, n. 23, p. 2939–2943, 1 dez. 2007.

ZAPATKA, M. et al. The landscape of viral associations in human cancers. **Nature Genetics**, p. 1–12, 5 fev. 2020.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55-78, 9 out. 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, maio 2002.

TRABERT, B. et al. Progesterone and breast cancer. **Endocrine reviews**, 2019.

