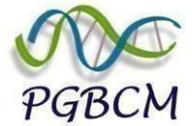




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO  
DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR  
E MOLECULAR



DOUGLAS DE LUCENA SILVA

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 E 31 EM CARCINOMA  
MAMÁRIO DE PACIENTES DO ESTADO DA PARAÍBA**

JOÃO PESSOA – PB

2022

DOUGLAS DE LUCENA SILVA

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 E 31 EM CARCINOMA  
MAMÁRIO DE PACIENTES 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.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Pavla Almeida  
Diniz Gurgel

**Coorientadora:** Prof. Dr. Eleonidas Moura  
Lima

JOÃO PESSOA – PB

2022

## Catálogo na publicação Seção de Catalogação e

S586d Silva, Douglas de Lucena.

Detecção do papilomavírus humano 16 e 31 em carcinoma mamário de pacientes do estado da Paraíba /Douglas de Lucena Silva. - João Pessoa, 2022. 69 f. : il.

Orientação: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel. Coorientação:

Eleonidas Moura Lima.

Dissertação (Mestrado)

- UFPB/CCEN.

1. Papilomavírus humano. 2. Câncer de mama. 3. Coinfecção. I. Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz. II. Lima, Eleonidas Moura. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616-006.52(043)

### Classificação



Ata da Sessão Pública da Defesa de Dissertação de Mestrado do discente **Douglas de Lucena Silva**, candidato ao Título de Mestre em Biologia Celular e Molecular - Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

1 Aos trinta dias do mês de março de dois mil e vinte e três, às quatorze horas, reuniram-se, no  
2 Auditório do Departamento de Biologia Molecular - CCEN/UFPB, os membros da Banca  
3 Examinadora, composta pelos Professores Doutores: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel  
4 (Orientador / Presidente), Eleonidas Moura Lima (Examinador interno) e Maria Angélica  
5 Ramos da Silva (Examinador externo) constituída para examinar o candidato **Douglas de**  
6 **Lucena Silva** ao grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em  
7 Biologia Celular e Molecular. Iniciando a sessão, na qualidade de Presidente, a Professora  
8 Doutora Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel comunicou aos presentes a finalidade da reunião. A  
9 seguir, concedeu a palavra para que o candidato fizesse, oralmente, a exposição do trabalho  
10 intitulado "*DETECCÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 E 31 EM CARCINOMA*  
11 *MAMÁRIO DE PACIENTES DO ESTADO DA PARAÍBA*". Concluída a exposição, o  
12 candidato foi arguido pela Banca Examinadora, que avaliou, julgou e proferiu o seguinte  
13 parecer: "**aprovado**". Ao final da sessão, a orientadora preencheu a Ficha de Avaliação e  
14 emitiu o Relatório Final, para serem encaminhados ao Colegiado deste Programa para  
15 homologação. E, para constar, eu, Maria do Socorro de Oliveira Souza, Assistente em  
16 Administração, lavrei a presente ata, que assino junto com os membros da Banca  
17 Examinadora.

\_\_\_\_\_  
Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel

Orientador / Presidente

Coorientador

\_\_\_\_\_  
Eleonidas Moura Lima

Examinador Interno

\_\_\_\_\_  
Maria Angélica Ramos da Silva

Examinador Externo

\_\_\_\_\_  
Douglas de Lucena Silva

Discente

\_\_\_\_\_  
Maria do Socorro de Oliveira Souza

Assistente em Administração

DOUGLAS DE LUCENA SILVA

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 16 E 31 EM CARCINOMA  
MAMÁRIO DE PACIENTES DO ESTADO DA PARAÍBA**

Dissertação de mestrado avaliada em

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel

Coordenadora Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular (UFPB)  
Orientador

---

Prof. Dr. Eleônidas Moura Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPB)  
Coorientador

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Angélica Ramos da Silva

Professora do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia –IFPB  
Examinador externo

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Deus, pela permissão divina de alcançar esse objetivo.

A minha mãe, Terezinha Diniz de Lucena Silva, pelo amor e apoio para que eu concluísse essa jornada. Aos meus irmãos, Gutemberg e Blaucio Lucena e a minha prima Ianca Lucena pelas palavras de incentivo.

A minha esposa, Rayssa Bastos Ventura Lucena, pelo amor, compreensão, por acreditar no meu potencial e pela companhia nos inúmeros finais de semana, assessorando-me nos protocolos do laboratório. Agradeço a toda minha família, meus sogros, Ailton Ventura e Giselda Bastos, minha cunhada Tuanny Ventura e meu concunhado Lucas Aragão, pelo apoio, torcida.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel e o meu co-orientador Dr. Eleonidas Moura Lima pelo apoio, paciência e conhecimento compartilhado. Vocês foram importantíssimos para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À UFPB por poder desenvolver o projeto, e aos órgãos de fomento pelo financiamento do estudo.

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 inúmeras ajudas administrativas

À Sr<sup>a</sup> Geralda Santana, aux. de serviços gerais, que mesmo durante o período de pandemia sempre deixou a sala na qual eu estudava, sem limpa e organizada.

À Seu Bosco, Téc. de Laboratório por todas as vezes que veio da sua casa para atender uma solicitação nossa.

À todos que fazem parte do nosso grupo de pesquisa (família Gurgel), o mestrando Igor Fernandes, Zhibelly Nunes e Niara Isis, que me ajudaram a superar a rotina árdua de um laboratório e por todo conhecimento compartilhado

Ao mestre e amigo, Paulo J. R. Oliveira, por toda a ajuda, pelos conselhos e incentivos ao longo dessa jornada.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

**“Como sei pouco, e sou pouco, faço o pouco que me cabe me dando por inteiro”  
(Poeta Thiago de Mello)**

## RESUMO

Diversos estudos têm detectado o Papilomavírus Humano (HPV), particularmente o HPV16, em tumores de mama. É sabido que que a Região Nordeste do Brasil apresenta uma alta prevalência de HPV16 e 31 em neoplasia cervical e câncer cervical. Entretanto, existem poucos estudos de detecção do HPV16 e 31 em câncer de mama (CM) da população do Nordeste do Brasil e não existe nenhum estudo no Estado da Paraíba. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi detectar o HPV16 e 31 em CM de mulheres do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Foram analisadas 186 blocos de parafina contendo fragmentos de carcinoma mamário, incluindo Luminal A, Luminal B, HER2, Super HER2 e Triplo negativo. A detecção do DNA viral foi realizada por PCR convencional e q-PCR. O DNA do HPV foi detectado em 48,38% (90/186) das amostras de câncer da mama. O HPV16 foi detectado em 44% (83/186) dos casos. O HPV31 foi detectado em 3,5% (7/189) dos casos. A coinfeção HPV16 e 31 foi encontrada em 1,6% (3/186). Uma associação significativa foi observada entre amostras de CM HPV-positivos, Ki-67 > 30 ( $p > 0.05$ ) e o índice mitótico ( $p > 0.05$ ). Dessa forma, a alta prevalência do HPV bem como o possível papel na agressividade do CM devem ser melhor compreendidas em regiões com uma alta prevalência do HPV.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de Mama. Papilomavírus Humano (HPV). HPV 16. HPV 31. Coinfeção.

## ABSTRACT

Several studies have detected Human Papillomavirus (HPV), particularly HPV16, in breast tumors. It is known that the Northeast Region of Brazil has a high prevalence of HPV16 and 31 in cervical neoplasia and cervical cancer. However, there are few studies of the detection of HPV16 and 31 in breast cancer (BC) in the population of Northeast Brazil, and there is no study in the State of Paraíba. Thus, the objective of this study was to detect HPV16 and 31 in MC of women in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. One hundred eighty-six paraffin blocks containing breast carcinoma fragments were analyzed, including Luminal A, Luminal B, HER2, Super HER2, and Triple negative. Viral DNA detection was performed by conventional PCR and q-PCR. HPV DNA was detected in 48,38% (90/186) breast cancer specimens. HPV16 was detected in 44% (83/186) of cases. HPV31 was detected in 3.5% (7/189) of patients. HPV16 and 31 coinfection was found in 1.6% (3/186). A significant association was observed between HPV-positive CM samples, Ki-67>30 ( $p>0.05$ ), and mitotic index ( $p>0.05$ ). Thus, the high prevalence of HPV as well as the possible role in the aggressiveness of BC should be better understood in regions with a high prevalence of HPV.

**Keywords:** Breast Cancer. Human Papillomavirus (HPV). HPV 16. HPV 31. Coinfection

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 A:</b> Incidência de câncer em pacientes de ambos os sexos, com idades entre 0- 85+ anos no ano de 2020.....	21
<b>Figura 1 B:</b> Estimativa de óbitos por câncer em pacientes de ambos os sexos, com idades entre 0-85+ anos no ano de 2020.....	21
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das diferentes regiões genômicas do HPV .....	26
<b>Figura 3:</b> Status físicos do HPV e seu mecanismo de integração.....	27
<b>Figura 4:</b> Vias de contaminação e possíveis rotas de transmissão: contato físico ou pela via hematológica.....	33
<b>Figura 5:</b> Ciclo da infecção viral do HPV .....	34
<b>Figura 6:</b> Desenho da possível associação de E6/E7 com HER-2 ocasionando o aumento da proliferação celular.....	35
<b>Figura7:</b> O complexo E6/E7/BRCA1 aumenta os níveis de expressão do ER- $\alpha$ , resultando na ampliação da divisão celular e posterior crescimento tumoral .....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos tumores de mama de acordo com a expressão dos receptores hormonais e fatores de crescimento. ....	23
<b>Tabela 2:</b> Estudos de detecção do DNA do HPV em tumores de mama .....	29
<b>Tabela 3:</b> Primer do gene E6 utilizado para tipificação do DNA do HPV 16 .....	39
<b>Tabela 4:</b> Primer dos genes e6 utilizado para tipificação do DNA do HPV 31 .....	39
<b>Tabela 5:</b> Caracterização das amostras de CM em relação a idade, localização anatômica, grau histológico, classificação histopatológica, classificação molecular, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão angiolinfática e expressão da proteína Ki-67. ....	41
<b>Tabela 6:</b> Análise de associação entre a idade, localização e tipo histopatológico do tumor e a presença do DNA do HPV .....	44
<b>Tabela 7:</b> Análise de associação entre expressão dos ER, PR, Ki-67 e a infecção do HPV nas amostras de CM .....	45
<b>Tabela 8:</b> Análise de associação entre o infiltrado inflamatório, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, grau de diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão vascular e a infecção do HPV nas amostras de CM .....	47
<b>Tabela 9:</b> Análise de associação entre a idade, localização e tipo histopatológico do tumor e a presença do DNA do HPV 16 em CM .....	49
<b>Tabela 10:</b> Análise de associação entre expressão dos ER, PR, Ki-67 e a infecção do HPV 16 nas amostras de CM .....	50
<b>Tabela 11:</b> Análise de associação entre o infiltrado inflamatório, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, grau de diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão vascular e a infecção do HPV 16 nas amostras de CM .....	51
<b>Tabela 12:</b> Frequência do HPV 31 relacionada com a idade, classificação histopatológica e a localização do tumor em carcinomas mamários .....	53
<b>Tabela 13:</b> Análise de associação entre expressão dos ER, PR, Ki-67 e a infecção do HPV 31 nas amostras de CM .....	54
<b>Tabela 14:</b> Análise de associação entre CM HPV 31-positivo e o infiltrado inflamatório, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, grau de diferenciação tubular, grau histopatológico e invasão vascular. ....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA Breast Cancer gene (1 e 2)

E Early

E1 Early region 1 (Oncogene do HPV)

E2 Early region 2 (Oncogene do HPV)

E5 Early region 5 (Oncogene do HPV)

E6 Early region 6 (Oncogene do HPV)

E7 Earlyregion 7 (Oncogene do HPV)

GP GP5+ e GP6+ - Iniciadores utilizados em PCR

L Late

L1 Late region1 (Oncogene do HPV)

L2 Late region 2 (Oncogene do HPV)

LCR Long Control Regi

MY MY09 e MY11 – Iniciadores utilizados em PCR

DBH Do inglês, hibridization dot blot

CM Câncer de mama/ Carcinoma mamário

DK Quinase dependente de ciclina

CIP1 Proteinase cisteína 1 (Cysteine protei-  
nase-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 epi-  
dermal (Epidermal growth factor receptor)

ER Receptor de estrógeno (estrogen recep-  
tor)

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

MTV Vírus do Tumor Mamário Murino

NCR Região não codificante

OMS Organização Mundial de Saúde

TNE/SOE- Carcinoma ductual invasivo s/ outra especificação/Carcinoma ductual invasivo sem outras especificações;

CDI- Carcinoma ductual infiltrante;

CDIISBR- Carcinoma ductual infiltrante intermediário de Scarff-Bloom-Richardson;

CDINV- Carcinoma ductual invasivo;

CDL- Carcinoma mamário invasivo com características ductuais e lobulares;

CINADER- Carcinoma intraductual de padrão aderente;

CILOB- Carcinoma invasivo de padrão morfológico lobular

CDIAPOC- Carcinoma invasivo de padrão apócrino

IIEA: Infiltrado inflamatório no estroma tumoral ausente;

IILP E: Infiltrado inflamatório Linfoplasmocitário peritumoral escasso;

INPM: Infiltrado neoplásico peritumoral peritoneal moderado;

INPA: Inflamação peritoneal ausente;

E:Escasso; M:Moderado;

I: Intenso; A: Ausente;

L: Leve;

IITD: Infiltrado inflamatório tumoral discreto;

ILETM: Infiltrado linfocitário no estroma tumoral mínimo ;

INPP: Inflamação perineural

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Epidemiologia do câncer de mama.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Classificação do câncer de mama .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Classificação molecular do câncer de mama .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Etiologia do câncer de mama.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 O Papilomavírus Humano (HPV).....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 HPV e o câncer de mama .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Rota de infecção do HPV no tecido mamário.....</b>	<b>32</b>
<b>2.8 O papel dos oncogenes E6 e E7 em tumores de mama .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Objetivo geral.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 População de estudo.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Extração e quantificação do DNA do HPV.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Análise da qualidade do DNA extraído .....</b>	<b>38</b>
<b>4.4 Detecção do DNA viral .....</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Genotipagem do DNA viral.....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Genotipagem do DNA do HPV16 .....</b>	<b>38</b>

<b>4.7 Genotipagem do DNA do HPV31.....</b>	<b>39</b>
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>40</b>
<b>6 ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>40</b>
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>7.1 Caracterização das amostras.....</b>	<b>41</b>
<b>7.2 Detecção do DNA do HPV nas amostras de CM .....</b>	<b>43</b>
<b>7.3 Detecção do DNA do HPV16 nas amostras de CM.....</b>	<b>48</b>
<b>7.4 Detecção do HPV31 em CM .....</b>	<b>53</b>
<b>7.5 Coinfecção HPV16 e HPV31.....</b>	<b>57</b>
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que foram registrados mais de 2 milhões de casos e 600 mil mortes em 2022 (SOERJOMATARAM; BRAY, 2021; SUNG et al., 2021). O CM é uma doença heterogênea e multifatorial, nos quais diversos fatores genéticos e ambientais estão envolvidos (BUYS et al., 2017; GUPTA et al., 2021).

Os fatores genéticos respondem por dez por cento dos casos de câncer de mama (BUYS et al., 2017). Dessa forma, os fatores ambientais respondem pela maioria dos novos diagnósticos (HSU et al., 2010; JOSHI; BUEHRING, 2012; KUDELA et al., 2022; MALHONE; LONGATTO-FILHO; FILASSI, 2018; USMAN et al., 2022). Dentre os fatores ambientais, as infecções virais persistentes têm sido muito estudadas devido o seu possível papel na tumorigênese e/ou na agressividade tumoral (HSU et al., 2010; KUDELA et al., 2022; MARETI et al., 2021).

As infecções causadas pelos oncovírus Epstein Baar vírus (EBV), Herpesvírus Humano subtipo 8 (HHV-8), Citomegalovírus (CMV) e a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) são atualmente as mais estudadas na carcinogênese mamária (AFZAL et al., 2022; ALINEZHADI et al., 2022, 2022; BAKHTIYRIZADEH et al., 2017; DELGADO-GARCÍA et al., 2017; EL-SHEIKH et al., 2021; GLASER; HSU; GULLEY, 2004; GOLROKH MOFRAD et al., 2021; GUMUS et al., 2006; GUPTA et al., 2022; HABYARIMANA et al., 2018; HEDAU et al., 2011; HERRERA-ROMANO et al., 2012; JOSHI; BUEHRING, 2012; KUDELA et al., 2022; LI; DING; ZHAI, 2015; NAGI et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022; SALMAN et al., 2017; USMAN et al., 2022).

Nesse cenário, diversos estudos têm mostrado a presença do DNA do HPV bem como a expressão dos ongenes E6 e E7 em carcinomas mamários (ALINEZHADI et al., 2022; CAVALCANTE et al., 2018; ESLAMIFAR et al., 2015; FU et al., 2015; GEBREGZABHER et al., 2021; LI; DING; ZHAI, 2015; WANG et al., 2012a, 2012a). A prevalência do HPV em carcinomas mamários varia de acordo com a localização geográfica. Os HPVs mais prevalentes são os genótipos 16, 18 e 31 (WANG et al., 2012a).

Um estudo prévio, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, detectou a presença de HPV em 60% dos tumores de mama de mulheres no Estado da Paraíba (Nunes, ZSM., 2020). Nesse

mesmo estudo, também foi reportando a presença de 60% de HPV16 em CM. Apesar da importância e da alta prevalência, ainda não existem estudos de detecção de outros tipos virais de HPV em tumores de mama no Estado. Além disso, também não existem estudos sobre a coinfeção do HPV 16 e 31 em amostras de tumores de mama de pacientes oriundos do Estado da Paraíba. Dessa forma, o presente estudo reporta a detecção dos HPV16 e HPV31 e da coinfeção dos HPVs 16 e 31 em tumores de mama de pacientes oriundos do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

## **2.REFERENCIAL TEÓRICO**

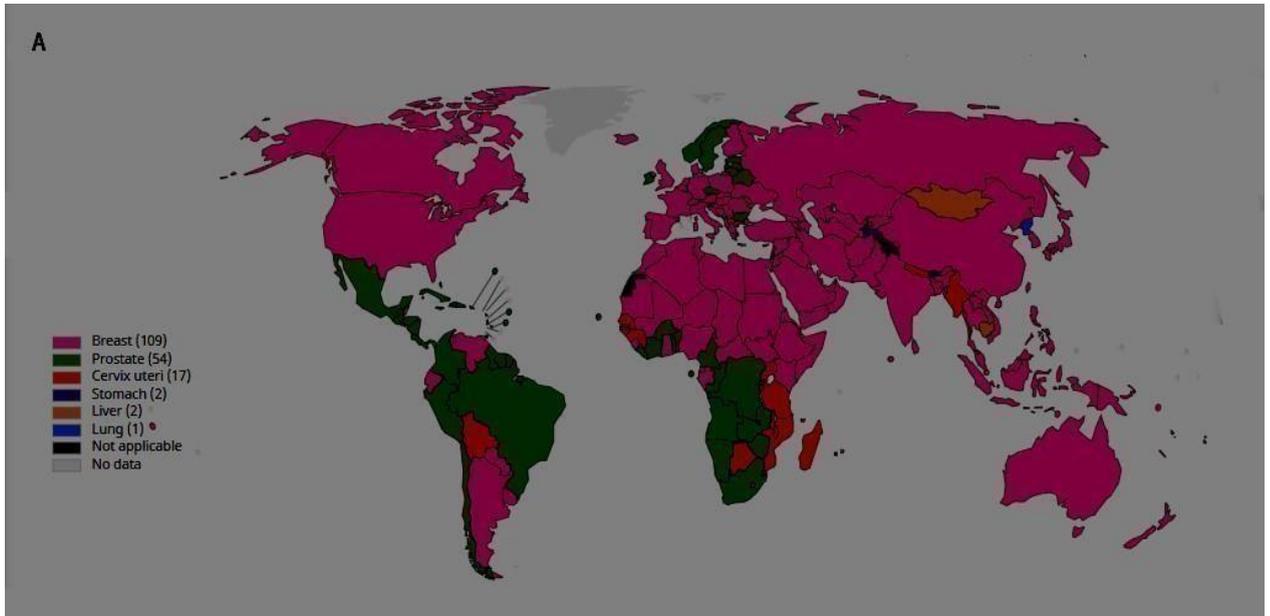
### **2.1 Epidemiologia do câncer de mama**

O câncer é um sério problema de saúde pública em todos os países. Os dados da OMS reportaram 19 milhões de novos diagnósticos de câncer e 10 milhões de mortes em 2020 (SOERJOMATARAM; BRAY, 2021; SUNG et al., 2021). Deste total, 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama (CM) foram reportados, com 685,000 mortes em 2020 (**Figura 1-A**) (SOERJOMATARAM; BRAY, 2021; SUNG et al., 2021).

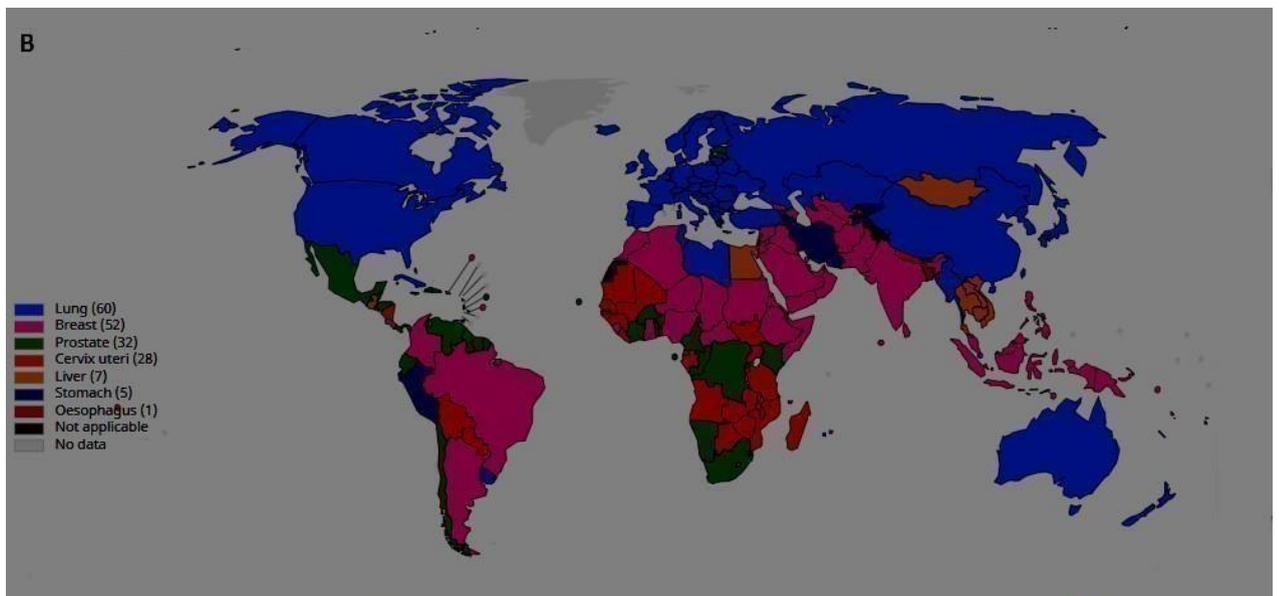
O câncer de mama apresenta maior incidência (47.8/100 mil habitantes), ultrapassando o câncer de próstata (30.7/100 mil habitantes). Os dados demonstram que, em 2020, o câncer de mama foi a segunda maior causa de mortes entre todos os tipos de câncer (13.6/100 mil habitantes), ficando atrás apenas do câncer de pulmão (18.0 /100 mil habitantes) (SOERJOMATARAM; BRAY, 2021; SUNG et al., 2021).

No Brasil, o câncer de mama lidera as estimativas para o biênio 2023/2025, entre os tipos de tumores mais incidentes no país, com um risco estimado de aproximadamente 66,54 novos diagnósticos para cada 100/mil mulheres. Por região, o risco estimado para cada 100/mulheres é liderado pela região Sudeste, com 84,46, seguido do Sul 71,44%, Centro-Oeste 57,28% , Nordeste 52,28% e Norte 24,99%. Estima-se que a Paraíba registre 15.690 novos diagnósticos de CM no biênio 2023/2025. Uma incidência de 41,37%/100 mil habitantes (INCA, 2022).

A taxa de mortalidade por câncer de mama (**Figura 1-B**), ajustada pela população mundial, foi 11,83 óbitos/100.000 mulheres, em 2020. No Brasil, o ranking de mortalidade causada por câncer de mama, lidera na maioria das regiões do país, com maior prevalência no Sudeste, (12,64 óbitos/100 mil habitantes) e Sul (12,79 óbitos/100 mil habitantes) (INCA, 2022).



**Figura 1 A:** Incidência de câncer em pacientes de ambos os sexos, com idades entre 0-85+ anos no ano de 2020. Fonte: GLOBOCAN, 2020



**Figura 1 B:** Estimativa de óbitos por câncer em pacientes de ambos os sexos, com idades entre 0-85+ anos no ano de 2020. Fonte: GLOBOCAN, 2020.

## 2.2 Classificação do câncer de mama

Desde 2013, a Organização Mundial da Saúde OMS classifica os tumores de mama em lesões precursoras, lesões de baixo potencial maligno, proliferações epiteliais benignas, neoplasias fibroepiteliais, mioepiteliais, mesenquimais e lesões invasivas. A atual classificação dos tipos de tumores de mama abrange diversos aspectos morfológicos e de expressão gênica (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018). Dessa forma, atualmente a OMS classifica os tumores de mama em:

1. **Lesões precursoras**, incluindo o carcinoma ductal *in situ* e a neoplasia lobular;
2. **Lesões proliferativas intraductais**, abrangendo a hiperplasia ductal não usual, lesões de células colunares e hiperplasia ductal atípica (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018);
3. **Lesões papilares**, contendo papiloma intraductal, carcinoma papilar intraductal, carcinoma papilar encapsulado e carcinoma papilar sólido (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018);
4. **Carcinoma invasivo**, contendo 10 tipos de tumores, carcinoma lobular invasivo, carcinoma do tipo não especial, carcinoma mucino, carcinoma micropapilar invasivo, carcinoma com características medulares, carcinoma tubular, carcinoma com diferenciação apócrina, carcinoma cribriforme, carcinoma com células diferenciadas *signet-ring* carcinoma metaplásico do tipo não especial (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018);
5. **Tumores de origem epitelial/mioepitelial**: incluindo o carcinoma com adenomioepitelioma e carcinoma adenoide cístico (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018);
6. **Tipos raros**: abrangendo os carcinomas neuroendócrinos, carcinoma oncocítico, carcinoma *lipid-rich*, carcinoma papilar invasivo, carcinoma de células acínicas, carcinoma secretório, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma polimorfos, carcinoma de células *glycogen-rich* e carcinoma sebáceo (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018).

## 2.3 Classificação molecular do câncer de mama

Análises de expressão gênica de 8.000 genes, realizadas através da técnica de CGH array, propiciaram um avanço importante na compreensão da heterogeneidade molecular do câncer de mama, apesar das semelhanças histopatológicas (HAMMOND et al., 2010; PEROU et al., 2000; WOLFF et al., 2013). Inicialmente, esses estudos demonstraram alterações na expressão do receptor de estrógeno (ER) e do receptor de progesterona (PR).

Mais recentemente, a expressão do receptor HER-2 e da proteína Ki-67 também tem sido utilizada para a determinação da classificação molecular do tipo de câncer de mama (HAMMOND et al., 2010; PEROU et al., 2000; WOLFF et al., 2013). Dessa forma, com base na expressão do ER, PR e HER-2, a classificação molecular dos tumores de mama é a seguinte:

2.3.1 **Luminal A** – Tumores de mama com a expressão do ER e/ou PR, negativo para o HER2 e com níveis de Ki-67 < 14% (Tabela 1) (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018; HAMMOND et al., 2010; PEROU et al., 2000; WOLFF et al., 2013);

2.3.2 **Luminal B** - Tumores de mama com a expressão dos genes HER2, Ki-67, Ciclina B1 e B-Myb. Particularmente no Luminal HER2, ocorre uma superexpressão de HER2 e baixa expressão das citoqueratinas (CK) 7, 8, 18 e 19 (Tabela 1) (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018; HAMMOND et al., 2010; PEROU et al., 2000; WOLFF et al., 2013);

2.3.3 **Basal-like** - Tumores de mama que se caracterizam por apresentar as mutações nos genes da TP53 e BRCA1. Além das mutações, estes tumores se caracterizam-se pela expressão do EGFR, HER1, CK (5,6,14 e 17), P-caderina e p63 e não expressam ER, PR e HER2 (Tabela 1) (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018; HAMMOND et al., 2010; PEROU et al., 2000; WOLFF et al., 2013);

2.3.4 **Triplo negativo (do Inglês, Triple Negative Breast Cancer - TNBC)** – Tumores de mama que não expressam ER, PR e HER2, sendo 95% classificados como ductal invasivo (Tabela 1) (GIULIANO; EDGE; HORTOBAGYI, 2018; HAMMOND et al., 2010; PEROU et al., 2000; WOLFF et al., 2013).

**Tabela 1:** Classificação dos tumores de mama de acordo com a expressão dos receptores hormonais e fatores de crescimento.

	LUMINALA	LUMINALB	HER2	TNBC	BASAL-LIKE

<b>RE</b>	+++	++/+++	-	-	-
<b>RP</b>	+	+/-	-	-	-
<b>HER2</b>	-	+/-	+	-	-
<b>Ki67</b>	<15 ou <20%	>15 ou >20%	>20%	-	-
<b>Ck5/6</b>	-	-	-	+/-	+
<b>EGFR</b>	-	-	-	+/-	+
<b>Agressividade</b>	+	++/+++	+++	+++	+++

**Fonte:** ADAPTADO de Nunes, Z.S.M., 2020; Brum, 2020; RE (receptor de estrogênio), RP (receptor de progesterona), HER2 (fator de crescimento epitelial humano 2), Ki-67 (proteína codificada pelo gene MKI67), Ck 5/6 (Citoqueratina 5/6) e EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico).

## 2.4 Etiologia do câncer de mama

O CM é uma doença heterogênea e multifatorial, nos quais os fatores genéticos, epigenéticos e ambientais estão envolvidos (BUYS et al., 2017; GUPTA et al., 2022). Diversos estudos têm demonstrado que mutações nos genes supressores tumorais BRCA1, BRCA2 aumentam em duas vezes o risco de câncer de mama. Além dos genes BRCA1/2, mutações nos genes CHEK2, BRIP1 (BACH1), ATM e PALB2 também tem sido associado com o CM (ACETO et al., 2010; BUYS et al., 2017; FAN et al., 1999; FASANO; MUGGIA, 2009; HERNÁNDEZ et al., 2014; YIANNAKOPOULOU, 2014).

As mutações mais as variantes de BRCA1 e BRCA2 são os principais fatores de risco genético para o desenvolvimento de CM e de ovário (BRITT; CUZICK; PHILLIPS, 2020; LEE; MOON; KIM, 2020). Em portadoras de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, com história familiar de CM, as estimativas para desenvolver um CM até os 70 anos de idade são de 40% a 87% para os portadores de mutações em BRCA1 e de 27% a 84% para os portadores de mutações no gene BRCA2 (LEE; MOON; KIM, 2020).

Alguns fatores ambientais também estão associados ao desenvolvimento de tumores de mama tais como obesidade, idade, uso frequente de álcool, contracepção, história reprodutiva, histórico familiar de CM, densidade da mama, uso de tabaco e infecções (AGUAYO et al., 2011b; BRITT; CUZICK; PHILLIPS, 2020; CALDERON et al., 2022; GUPTA et al., 2021, 2022; KUDELA et al., 2022; METWALLY et al., 2021; MOSTAFAEI et al., 2020; STRUMYLAITĖ; MECHONOŠINA; TAMAŠAUSKAS, 2010). Dentre os fatores ambientais supracitados, a presença de oncovírus e a expressão de oncogenes virais tem sido reportada em diversos estudos. Dentre os oncovírus, os mais encontrados em tumores de mama são o Tumor Mamário Murino (MMTV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o Papilomavírus humano (HPV)

(CAVALCANTE et al., 2018; DE CAROLIS et al., 2019; FU et al., 2015; GUPTA et al., 2021, 2022; JOSHI; BUEHRING, 2012; METWALLY et al., 2021; NGAN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2022; PAO et al., 1997; SALMAN et al., 2017).

Particularmente em relação ao HPV, diversos estudos tem demonstrado a presença dos genótipos HPV 16, 18 e 31 e a expressão de alguns oncogenes do HPV16, sugerindo o envolvimento desses agentes etiológicos de forma direta ou indiretamente no CM em humanos (ARALDI et al., 2018; ATIQUÉ et al., 2017; CAVALCANTE et al., 2018; CHEN et al., 2015; CORBEX et al., 2014; EL-SHEIKH et al., 2021; HERRERA-ROMANO et al., 2012; HSU et al., 2010; ISLAM et al., 2017; SALMAN et al., 2017; SHER et al., 2020; WANG et al., 2012b).

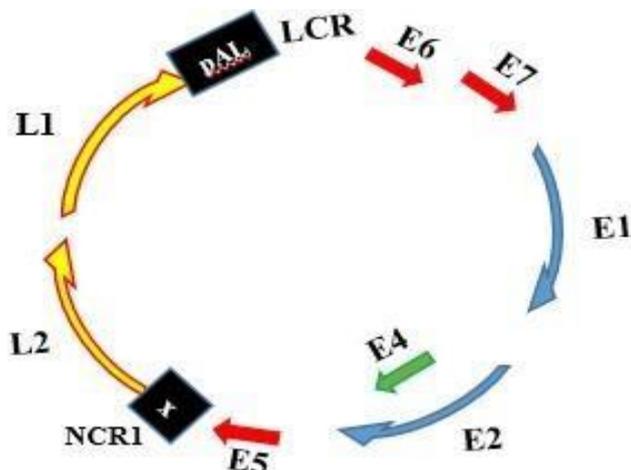
## 2.5 O Papilomavírus Humano (HPV)

*Papillomaviridae* é uma família de pequenos vírus não envelopados, cujo diâmetro é de aproximadamente 55 nm, com DNA de fita dupla medindo entre 6.000 a 8.000 pb. O capsídeo viral apresenta, aproximadamente, 600 Å de diâmetro, sendo formado pelas proteínas L1 e L2. Esse grupo de vírus caracterizam-se por ser espécie-específico e infectam diversos hospedeiros, tais como peixes, aves e mamíferos. A família *Papillomaviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Firstpapillomavirinae* e *Secondpapillomavirinae*. A subfamília *Firstpapillomavirinae* contém 50 gêneros e 130 espécies, incluindo os HPVs (VAN DOORSLAER et al., 2018).

O genoma do HPV é dividido em três regiões funcionais. A primeira região é denominada de inicial (do Inglês, *Early*), responsável por codificar proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (DELLA FERA et al., 2021; MCBRIDE, 2013; ZUR HAUSEN, 2000, 2009). Esta região do genoma viral codificam proteínas responsáveis pela transcrição, replicação viral e da transformação celular. A segunda região é chamada de tardia (do Inglês, *Late*), responsável por codificar as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral.

A terceira e última região é chamada de LCR (do Inglês, *Long Control Region*) e caracteriza-se por ser uma região reguladora da expressão gênica viral e onde estão localizados os sítios de poliadenilação. A LCR se localiza após o quadro de leitura abertos L1 antes do E6. A LCR contém a sequência gênica da origem da replicação e os sítios de ligação para os fatores de transcrição viral e celular. Cada capsídeo empacota uma única cópia do DNA circular viral (DELLA FERA et al., 2021; MCBRIDE, 2013; VAN DOORSLAER et al., 2018; ZUR HAUSEN, 2009).

**Figura2:** Representação esquemática das diferentes regiões genômicas do HPV



O HPV é um vírus que infecta epitélio e mucosa, sendo espécie-específico (DELLA FERA et al., 2021; VAN DOORSLAER et al., 2018). Diversos estudos epidemiológicos tem demonstrado a presença do HPV em neoplasias intraepiteliais e câncer, sendo o câncer cervical o mais reportado. Alguns genótipos dos HPVs, particularmente os HPVS 16, 31, 33 e 58, são mais frequentemente encontrado em câncer genital e de cabeça e pescoço quando comparados à outros genótipos (DELLA FERA et al., 2021; ZUR HAUSEN, 2002).

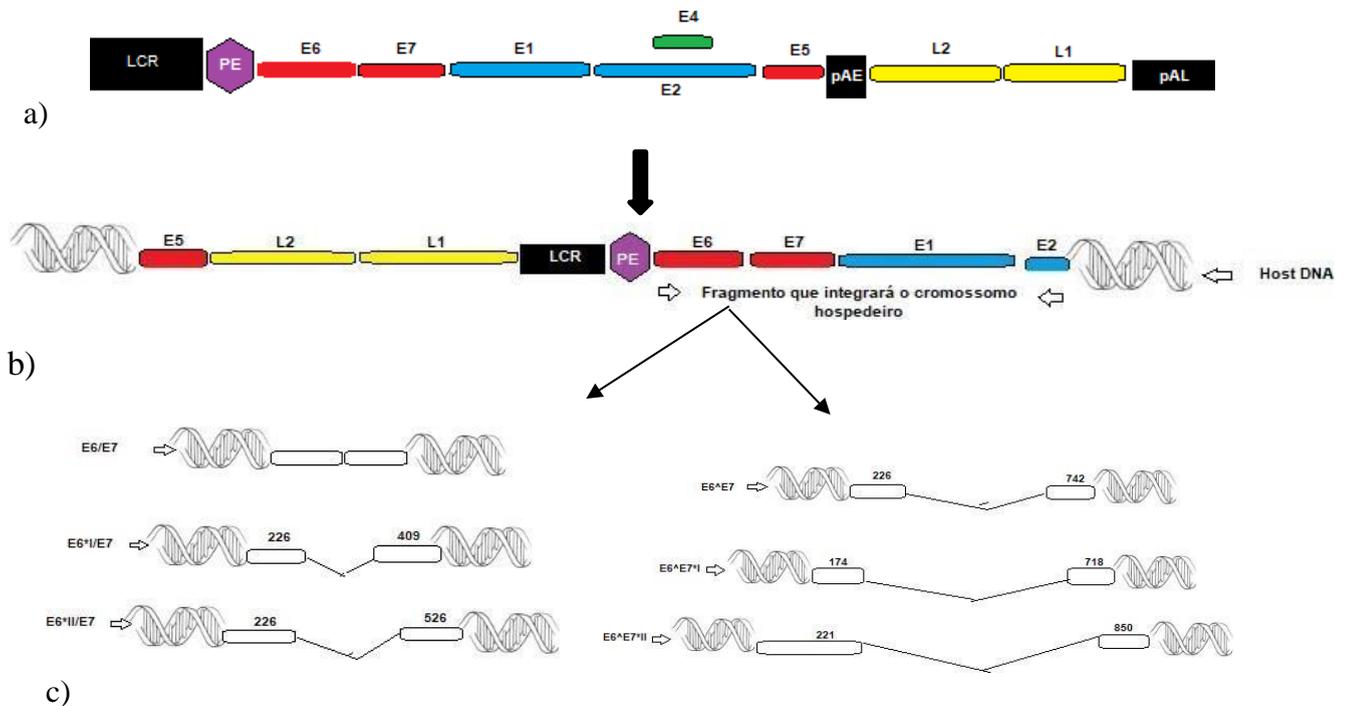
Com base nessa observação, os HPVs são classificados de acordo com o grau de risco para o câncer cervical em: *i*) HPV de alto risco oncogênico (HR-HPV) - cujas oncoproteínas podem realizar a transformação celular, culminando em neoplasias e câncer cervical; *ii*) HPVs de baixo risco (LR-HPV), que causam infecções assintomáticas ou papilomas benignos (DELLA FERA et al., 2021; DOORBAR, 2005; ZUR HAUSEN, 2009).

Os HPVs de alto risco tem uma maior propensão a incorpora-se ao genoma do hospedeiro, induzindo a deterioração do ciclo de controle celular. A integração propicia a propagação celular, causando inconsistências genéticas graduais (ZHANG et al., 2014). A incorporação do DNA viral ocorre em regiões fragilizadas do genoma do hospedeiro chamadas de “*hot spots*” (DOORBA, 2007).

Essas regiões também são chamadas de *common fragile sites* (CFS). São sítios relacionados à deleções e apresentam genes de supressores tumorais (YU et al., 2005). Portanto, a integração pode levar a expressão das oncoproteínas, bem como, a mutagenese insercional. Em ambos os casos, ocasionará a transformação celular (XU et al., 2012). Ademais, a integração é capaz de modificar padrões epigenéticos, favorecendo alterações na expressão gênica e a formação de splice alternativos (SMELLENG et al., 2012). Como mostrado na (figura 3c).

Além do papel na carcinogênese cervical, o HPV tem sido relacionados com outros cânceres genitais, como pênis, ânus e vagina, câncer de cabeça e pescoço, pulmão, estômago, esôfago e mama (BADARACCO et al., 2000; BODAGHI et al., 2005; CONCEIÇÃO GOMES NASCIMENTO et al., 2021; DE CAROLIS et al., 2019; DI LONARDO; VENUTI; MARCANTE, 1992; D'SOUZA et al., 2007; FAKHRY; GILLISON, 2006; FREGA et al., 2012; JEANNOT et al., 2016; KLEIN; AMIN KOTB; PETERSEN, 2009; LANGER, 2012; MORK et al., 2001; SHUKLA et al., 2009; ZANDBERG et al., 2013).

**Figura3:** Status físicos do HPV e seu mecanismo de integração- (a) o DNA viral na forma linear, (b) temos a forma mais frequente de integração presente no câncer cervical, nesse padrão temos uma deleção de E2. (c) verificamos diferentes splicings dos transcritos E6/E7 do HPV, as linhas representam os íntrons.



Fonte: Autoria própria.

## 2.6 HPV e o câncer de mama

Estudos têm mostrado a presença do DNA do HPV bem como a expressão dos oncogenes virais E6 e E7 em amostras de CM. A presença do DNA do HPV foi inicialmente descrita por DI LONARDO et al., 1992, que mostrou a presença do HPV16 em 29,4% dos carcinomas de mama na população estudada, sendo 13,3% presentes também em linfonodos

metastáticos (DI LONARDO; VENUTI; MARCANTE, 1992).

Desde então, diversos estudos mostraram a presença do DNA do HPV nos diferentes tumores de mama, incluindo tecido fresco e fragmentos de tecido emblocados (AGUAYO et al., 2011; BALCI; URAS; FELDMAN, 2019; BALTZELLE et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2018; DE CAROLIS et al., 2019; DELGADO-GARCÍA et al., 2017; DI LONARDO; VENUTI; MARCANTE, 1992; DOOSTI et al., 2016; FREGA et al., 2012; FU et al., 2015; GUPTA et al., 2021, 2022; HABYARIMANA et al., 2018; HAGHSHENAS et al., 2016; HERRERA-ROMANO et al., 2012; KARIMI et al., 2016; LAWSON et al., 2015; MALDONADO-RODRÍGUEZ et al., 2022; NAGI et al., 2021; NGAN et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2022; REZAEI; RASSI; MANSUR, 2017; WANG et al., 2012).

Os estudos publicados sobre a detecção do DNA do HPV e os tumores de mama são contraditórios, com a prevalência relatada do HPV variando de 0% a 86,21% em amostras de CM (G. DE LIMA et al., 2016; KUDELA et al., 2022; WANG et al., 2012b). A aparente discrepância desses resultados pode ser explicada pela heterogeneidade do câncer de mama, tendo em vista que a possibilidade de maior interação das oncoproteínas E5, E6 e E7 em tumores TBNC e HER2 quando comparados aos demais tipos moleculares de tumores de mama (KUDELA et al., 2022).

Uma outra hipótese para as diferenças de prevalência de HPV pode estar relacionada com as diferentes estratégias de detecção do DNA viral utilizadas nos estudos, tais como PCR convencional, PCR/sequenciamento, hibridização *in situ* e imunohistoquímica (G. DE LIMA et al., 2016; KUDELA et al., 2022; WANG et al., 2012b). Uma terceira provável explicação para as discrepâncias nos percentuais de detecção seria o tipo de material biológico utilizado para a detecção do DNA do HPV, uma vez que fragmentos de tumores mamários emblocados em parafina degradar o DNA em fragmentos de até 300 pb, dificultando a detecção viral (G. DE LIMA et al., 2016; KUDELA et al., 2022; WANG et al., 2012b).

Estudos também tem mostrado que a prevalência e a carga viral do DNA do HPV em tumores de mama varia conforme a idade, tipo de HPV e características moleculares tumorais (CHOI et al., 2016; KHAN et al., 2008b; WANG et al., 2012b). Além disso, a presença do HR-HPV nos núcleos das células tumorais mamárias e a presença dos coilócitos HPV-positivos em várias amostras normais e de câncer de mama, evidenciam que o HPV pode ter um papel no desenvolvimento dos tumores de mama (LAWSON et al., 2009).

Contudo, apesar das evidências, o papel do HPV no tecido mamário tumoral tem sido controverso. Diversos estudos têm hipotetizado o envolvimento do HPV como agente direto do câncer de mama, em um mecanismo denominado *hit-and-run*, em que o vírus age como um

iniciador na carcinogênese e depois desaparece, culminando em um resultado falso negativo (BALCI; URAS; FELDMAN, 2019; G. DE LIMA et al., 2016; KUDELA et al., 2022; NGAN et al., 2015).

Além disso, o HPV pode também estar relacionado com uma maior agressividade tumoral quando comparados com outros tumores de mama sem a infecção viral (G. DE LIMA et al., 2016; KUDELA et al., 2022). O HPV16 é o genótipo mais frequentemente reportado em tumores de mama. Outros genótipos de HPV também tem sido reportados, tais como o HPV6,11, 18, 31, 33, 45 e 52 (AGUAYO et al., 2011b; CHOI et al., 2016; DE CAROLIS et al., 2019; DOOSTI et al., 2016; FREGA et al., 2012; FU et al., 2015; GUPTA et al., 2021; HABYARIMANA et al., 2018; HERRERA-GOEPFERT et al., 2011a; LAWSON et al., 2015; NGAN et al., 2015; REZAEI; RASSI; MANSUR, 2017; SIGAROODI et al., 2012).

De forma semelhante ao câncer cervical, a prevalência dos HPVs em tumores de mama variam em diferentes populações. Por exemplo, o HPV16 é mais frequentemente reportado em tumores de mama de pacientes oriundo da América e o HPV18 é mais detectado em pacientes Chineses e Australianos (FU et al., 2015; HAGHSHENAS et al., 2016; KUDELA et al., 2022).

Estudos de detecção do DNA do HPV seguidos de sequenciamento, permitiram a classificação filogenéticas das variantes do HPV mais frequentemente encontradas em tumores de mama. Nesse cenário, um estudo desenvolvido por Slam et al., 2017 mostrou que a linhagem A (64,2%) do HPV16 é mais frequentemente detectado em tumores de mama, seguida da linhagem D (33,9%) e B (1,78%) (ISLAM et al., 2017).

Além da detecção do DNA do HPV, estudos tem mostrado a expressão dos oncogenes E6 e E7 em tumores de mama. Além da expressão dos transcritos E6/E7, estudos mais recentes têm mostrado diferentes transcritos E6/E7 no CM. Por exemplo, os transcritos E6<sup>E7</sup>\*I, E6<sup>E7</sup>\*II foi encontrado em tumores de mama, sugerindo que transcritos de E6/E7 alternativos podem estar relacionados com o CM. Os transcritos E6/E7 do HPV16 bem como suas isoformas E6<sup>E7</sup>\*I, E6<sup>E7</sup>\*II podem ser o resultado na integração de parte dos ongenes E6 e E7 no tecido mamário (ISLAM et al., 2017). Nesse sentido, Slam e colb., (2017) também reportaram a integração dos oncogenes E6/E7 ao genoma do hospedeiro em 86-100% dos casos de tumores de mama infectados por HPV, com a carga viral normalmente baixa, variando de 0.0005-9.3 cópias/células (ISLAM et al., 2017).

**Tabela 2:**Estudos de detecção do DNADo HPV em tumores de mama.

Ano		País	HPVs (%)	HPV 16 (%)	HPV31 (%)	Preservação do tecido	Método de detecção
1992	DiLonardo	Itália		28,24/40 (29,4%)		Tecido parafinado	PCR e hibridização in situ com sondas marcadas com biotina.
1996	Czerwenka <i>et al</i>	Áustria	20	0/20	0/20	Tecido parafinado	PCR, técnicas de hibridização de mancha (slot)
1996	Gopalkrishna <i>et al.</i>	India	30	0/30		Tecido congelado	PCR, Southern blot hybridization
1999	Hennig <i>et al.</i>	Noruega	41	19/41 (46%)		Tecido parafinado	PCR
2000	Yu <i>et al.</i>	China	14/32 (43.8%)	0/32		Tecido parafinado	PCR
2004	Damin <i>et al.</i>	Brasil	25/10 (24,7%)	14/25 (56%)		Tecido parafinado	PCR
2004	Damin <i>et al</i>	Brasil	25/101 (24,75%)	14/25 (56%)		Tecido parafinado	PCR
2004	Widschwendter <i>et al</i>	Austria	7/11 (64%)	7/11 (64%)		Tecido parafinado	PCR, HPV-ELISA
2005	de Villiers <i>et al.</i>	USA	25/29 (86%)	2/29 (6,89%)		Tecido parafinado	PCR
2005	de Villiers	USA	25/29	5/29		Tecido parafinado	PCR

			(86,20%)	(26,31%)			
2005	<i>Kan et al.</i>	Austrália	24/50 (48%)	0/50		Tecido congelado	PCR
2006	<i>Kroupis et al.</i>	Grécia	17/107 (15,9%)	14/17 (67%)		Amostras congeladas	PCR
2008	<i>Khan et al.</i>	Japão	26/124, (20,9%)	24/26, (92,3%)		Tecido parafinado	PCR
2008	<i>Akil et al.</i>	Síria	69/113 (61,06%)	9/87 (10,34%)	8/87 (9,20%)	Tecido parafinado	PCR
2008	<i>Akil et al.</i>	Síria	69/113 (61,06%)	9,98/113 (8,84%)	7,91/13 (7%)	Tecido parafinado	(PCR) e análise de microarray de tecido (TMA)
2009	<i>de Léon DC et al.</i>	México	15/51 (29,4%)	10/51 (19,6%)		Tecido parafinado	PCR
2009	<i>He Q et al.</i>	China	24/40	24/40		FFT	PCR
			(60%)	(60%)			
2011	<i>Herrera-Goepfert</i>	México	17/70 (24%)	17/70 (24%)	2/70 (2,86%)	Tecido parafinado	PCR
2012	<i>Glenn et al.</i>	Austrália	25/50 (50%)	25/50 (50%)		CPT	PCR
2014	<i>Ali et al.</i>	Iraque	60/129 (46,5%)	33/129 (25,53%)		Tecido parafinado	PCR in-situ
2014	<i>Ali SH et al.</i>	Iraque	60/129 (46,51%)	33/60 (55%)		Tecido parafinado	in situ
2014	<i>Ali et al.</i>	Iraque	60/129 (46,5%)	33/60 (55,5%)	39/60 (65%)	Tecido parafinado	in situ hybridization
2016	<i>Wang et al.</i>	China	52 /146 (35,61%)	23/146 (15,75%)		Tecido parafinado	PCR

2016	<i>Mohtasebi et al.</i>	Irã	27/84 (31,03%)	10/27 (37,03%)	1/27 (3,7%)	Tecido parafinado	PCR
2017	<i>Salman et al.</i>	Inglaterra	46/110 (42)	3/35 (8,57%)		Tecido fresco	PCR Sanger sequencing

2017	<i>Islam et al.</i>	India	203/213 (64,8%)	120/174 (69%)		CPT	PCR/Southern
2018	<i>Habyarimana et al.</i>	Ruanda	22/47 (46,81%)	36,31/47 (77,27%)	4,27/47 (9,09%)	Tecido parafinado	PCR
2019	<i>Khodabandehlou N et al.</i>	Irã	35/72 (48,6%)	13/72 (18,1%)		FFT	PCR
2019	<i>De Carolis et al.</i>	Itália	83/273 (30,4%)	16/83 (19,4%)	1,24/83 (3,5%)	Tecido parafinado	PCR digital e em tempo real;
2019	<i>Khodabandehlou et al.</i>	Irã	35/72 (48,6%)	13/72 (18,1%)		Nitrogênio Líquido	RT-PCR

2020	<i>Tawfeik et al.</i>	Egito	4/20 (20%)	3/4 (75%)	0/4 (0%)	Sangue	RT-PCR
2021	<i>El-Sheikh et al.</i>	Egito	16/72 (22,2%)	14/16 (87,5%)	0/16 (0%)	Amostras congeladas	RT-PCR

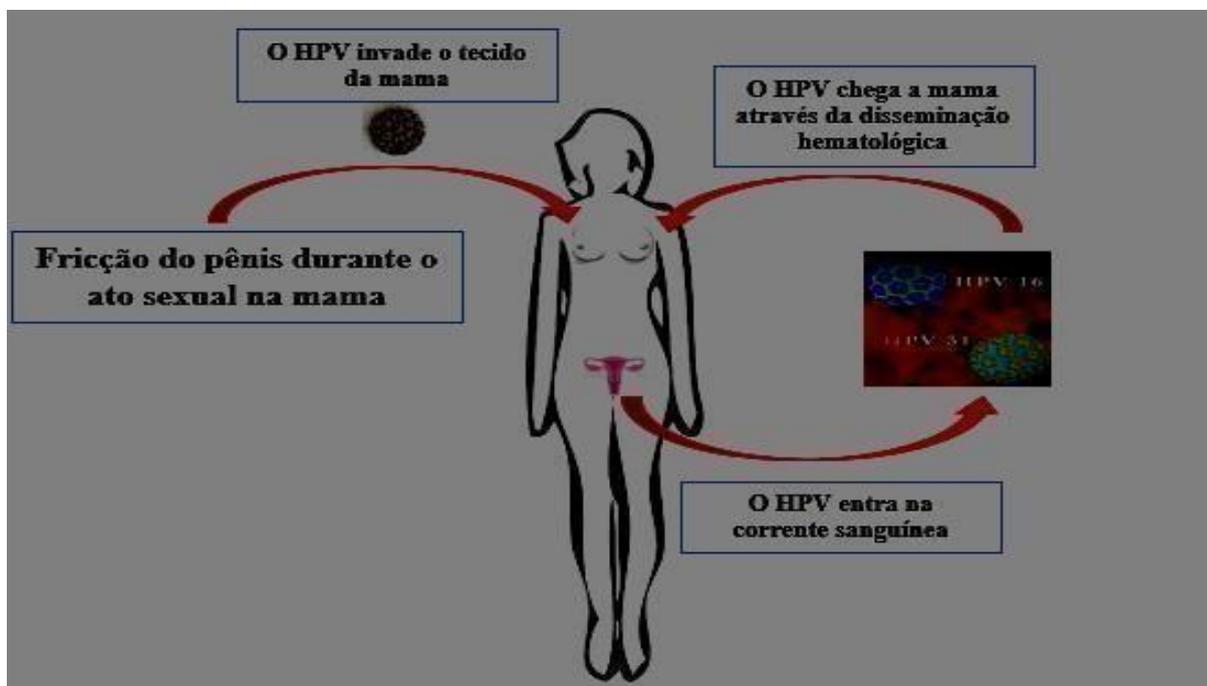
RT-PCR, reação em cadeia da polimerase em tempo real; PCR, reação em cadeia da polimerase; PCR/Seq, reação em cadeia da polimerase seguida de sequenciamento; PCR/Southern, reação em cadeia da polimerase seguida de Southern blot; PCR/ in situ, PCR seguida de hibridização in situ; MS-PCR; CPT, tecido de preservação criogênica; FFT tecido fresco congelado.

## 2.7 Rota de infecção do HPV no tecido mamário

Uma das principais características do HPV é ser espécie-específico e infectar preferencialmente determinados epitélios e/ou mucosas (DELLA FERA et al., 2021; DOORBAR, 2005; VAN DOORSLAER et al., 2018). Contudo, a infecção do HPV em

diferentes nichos, além do genital, tem sido reportada, como nos casos de linfócitos infectados por HPV, câncer de cabeça e pescoço e câncer de mama (BADARACCO et al., 2000; CONCEIÇÃO GOMES NASCIMENTO et al., 2021; DE CAROLIS et al., 2019; DI LONARDO; VENUTI; MARCANTE, 1992; D'SOUZA et al., 2007; FAKHRY; GILLISON, 2006; FREGA et al., 2012; JEANNOT et al., 2016; KLEIN; AMIN KOTB; PETERSEN, 2009; LANGER, 2012; MORKEt al., 2001; SHUKLAet al., 2009; ZANDBERGet al., 2013) .

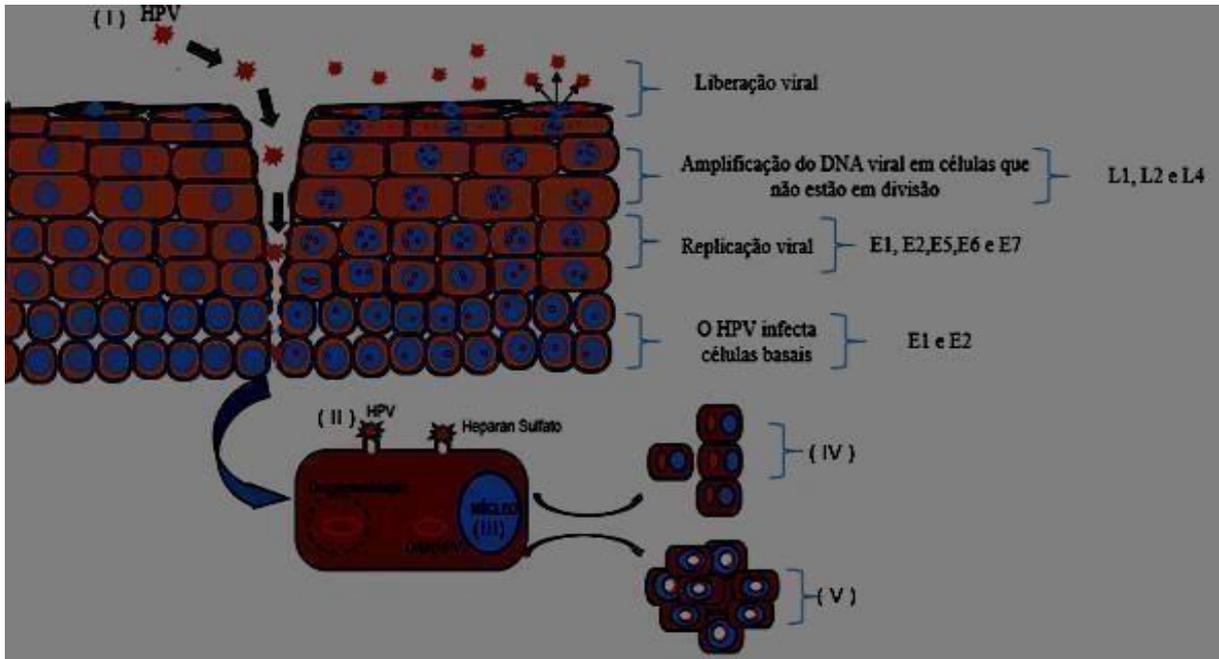
Particularmente em relação aos tumores de mama, a rota de infecção do HPV ainda não está totalmente elucidada. Nesse sentido, estudos tem mostrado a presença do DNA do HPV em tumores de mama de mulheres com câncer cervical ou histórico de lesões cervicais (HENNIG et al., 1999). Existem três hipóteses que podem explicar a presença do HPV em tecido mamário: *i)* A transmissão ocorre por meio do contato direto da região genital com a mama; *ii)* A disseminação de células ou população de clones tumorais, infectados por HPV, deum sítio primário para a mama; Disseminação do HPV-Livre em fluidos corpóreos; transporte através de vesículas; *iii)* Através do sexo oral ou através das microabrasões no tecido mamáriodurante a atividade sexual (DE CAROLIS et al., 2019; G. DE LIMA et al., 2016; HENNIG et al., 1999; KUDELA et al., 2022; WANG et al., 2012b).



**Figura 2:** Vias de contaminação e possíveis rotas de transmissão: contato físico ouela via hematológica. Fonte: Autoria própria.

De modo geral, o HPV penetra no tecido epitelial/cervical através de pequenas lesões

ou abrasões e alcança o interior da célula do tecido mamário através das vesículas de clatrina, na presença de heparan sulfato. Após a infecção das células basais, ocorre a replicação do DNA viral, com a amplificação do número de cópias virais contendo de 50 a 100 cópias por célula (DELLA FERA et al., 2021). O mecanismo pelo qual o HPV penetra nas células mamárias ainda não está elucidado.



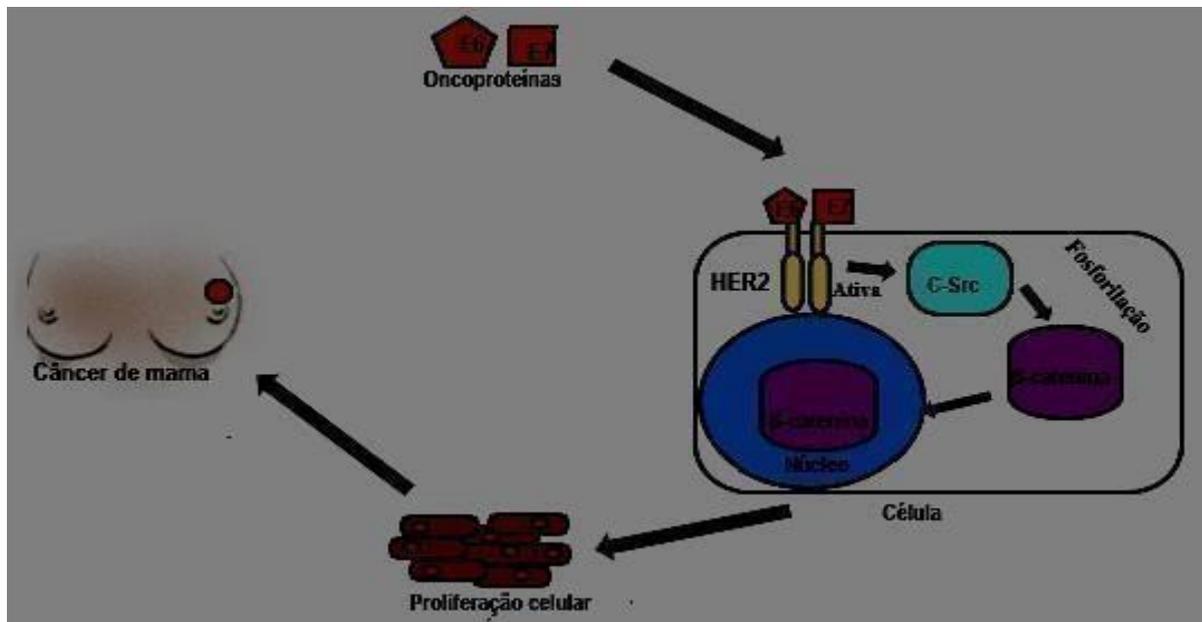
**Figura 3 :** Ciclo da infecção viral do HPV: (I) O HPV adentra o tecido através de uma fissura; (II) O vírus liga-se a receptores específicos presentes na membrana celular que auxiliaram na sua entrada na célula; (III) uma vez no interior da célula, o material genético viral dirige-se para o núcleo; (IV) uma vez no núcleo celular o DNA viral pode não integrar o cromossomo da célula hospedeira (Ciclo Lisogênico) ou (V) o DNA viral pode integrar o cromossomo da célula hospedeira (Ciclo Lítico) E6 e E7 interagem com as proteínas reguladoras levando a Tumorigênese. Fonte: Autoria própria.

## 2.8 O papel dos oncogenes E6 e E7 em tumores de mama

Apesar de existirem diversos estudos que mostram a presença do HPV em tumores de mama, o papel dos oncogenes E6 e E7 dos HPVs 16, 18 e 31 bem como as vias de interação proteína-proteína ainda são pouco estudados. Entretanto, as evidências mostram que, de forma semelhante ao câncer cervical, os oncogenes E6 e E7 participam da inativação dos protooncogenes e genes supressores tumorais. Nesse cenário, um estudo com cultura de células de tecido mamário mostrou que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 podem imortalizar essas

populações de células através da inativação da p53 e pRB, respectivamente (WOODS IGNATOSKI et al., 2005). Além disso, um estudo prévio mostrou que tumores de mama positivos para o HPV apresentam uma diminuição da expressão dos genes P53, BRCA1, BRCA, RB e um aumento da expressão das citocinas inflamatórias IL-1, IL6, IL-17, TGB- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF-K $\beta$  (ZHANG et al., 2005).

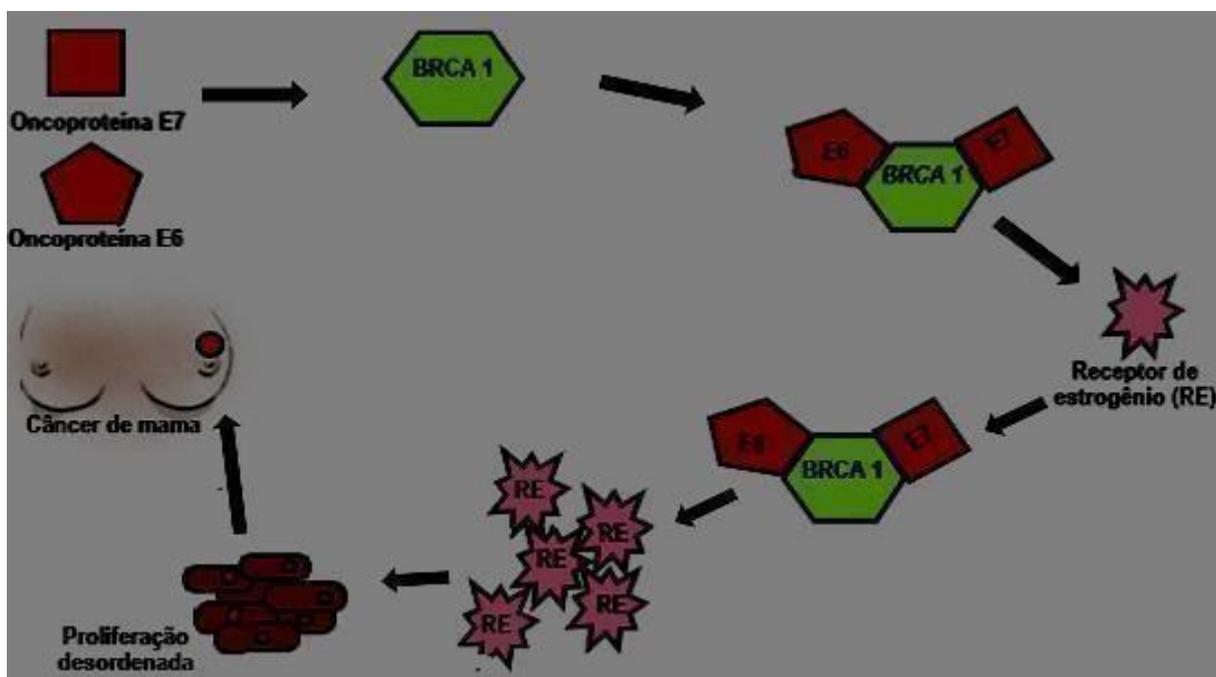
A formação do complexo E6/E7/HER-2 induz a transformação celular, amplifica e estabiliza a expressão do HER-2. O complexo E6/E7/HER-2 atua sobre a E-caderina/catenina, em carcinomas humanos. O complexo E6/E7/HER-2 está relacionado com tumores mais agressivos e invasivos e também pode estar relacionado com a transformação de células cancerosas da mama não-invasiva para invasiva (AL MOUSTAFA et al., 2004).



**Figura 4:** Desenho da possível associação de E6/E7 com HER-2 ocasionando o aumento da proliferação celular. Com a ligação de E6 e E7 com HER-2 ocorre a ativação de C-Src, está fosforila a  $\beta$ - cadenina, que sai do citoplasma para o núcleo. No núcleo ela modula desregula a transcrição celular, elevando a proliferação desordenada das células tumorais. Autoria própria.

O receptor de estrogênio está inerentemente associado com a infecção pelo HR-HPV, uma vez que o estrogênio pode afetar diretamente a transcrição de E6/E7 do HPV no câncer de mama. Ademais, as células ER-positivas podem ser um alvo inicial normal do HPV, porque estas células são ativadas por um aumento da sinalização de estrogênio. Dessa forma, o HPV pode desempenhar um papel no câncer de mama precoce, uma vez que existem sinais de uma relação entre estrogênios e da HR-HPV E6 / E7 nos estágios iniciais de câncer de mama (FISCHER et

al., 2017; FREGA et al., 2012; LIU et al., 1999; MOODY; LAIMINS, 2010; VIEIRA et al., 2014; WOODS IGNATOSKI et al., 2005; WU et al., 2007).



**Figura 5:** O complexo E6/E7/BRCA1 aumenta os níveis de expressão do ER- $\alpha$ , resultando na ampliação da divisão celular e posterior crescimento tumoral. Autoria própria.

Dessa forma, apesar das evidências de uma relação entre a presença do DNA do HPV bem como a expressão dos oncogenes virais E6 e E7 em tumores de mama, poucos estudos têm sido realizados no Nordeste do Brasil, onde existe uma alta incidência de câncer cervical. Um estudo prévio, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, mostrou que 60% das amostras de CM de pacientes residentes do Estado da Paraíba estavam infectados pelo HPV. Assim, o presente estudo busca uma melhor compreensão da prevalência do HPV16 e 31 em amostras de CM de pacientes do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Detectar o DNA do Papilomavírus humano 16 e 31 (HPV16 e HPV16) em amostras decarcinoma mamário oriundos de pacientes do Estado da Paraíba, Brasil;

Dectar e correlacionar com os fatores e a correlação com alguns cofatores;  
Investigar a coinfeccção.

### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Detectar o genoma do HPV16 usando a estratégia tipo-específico e PCR tradicional e qPCR em amostras parafinadas de câncer mama Luminal A, Luminal B, HER2 e TNBC, oriundos de pacientes do Estado da Paraíba, Brasil;

3.2.2 Detectar o genoma do HPV31 usando a estratégia tipo-específico e PCR tradicional e qPCR em amostras parafinadas de câncer mama Luminal A, Luminal B, HER2 e TNBC, oriundos de pacientes do Estado da Paraíba, Brasil;

3.3.3 Investigar possível coinfeção viral dos HPV16 e 31 em tumores mamários positivos para DNA do HPV em amostras de tumores de mama Luminal A, Luminal B, HER2 e TNBC, de pacientes oriundos do Estado da Paraíba, Brasil.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 População de estudo**

O presente estudo é retrospectivo experimental, e foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LBMEO), localizado no Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba – Campus I, João Pessoa. Foram analisadas 189 (cento e oitenta e nove) amostras de tecido parafinado, com diagnóstico histopatológico de carcinoma mamário, cedidas pelo banco de laudos do UNILAB/ Patologia Ivan Rodrigues, localizado também na cidade de João Pessoa, Estado da Paraíba. Foram incluídos no presente estudo 66 amostras com diagnóstico molecular luminal A, 37 luminal B, 31 HER2, 6 luminal HER2, 23 triplo negativo, 6 super HER2, 16 CM sem classificação. As coletas de fragmentos de tumores das pacientes foram realizadas entre agosto de 2016 até janeiro de 2017. A idade dos pacientes variou entre 27 a 91 anos.

### **4.2 Extração e quantificação do DNA do HPV**

As amostras de CM foram submetidas à extração do DNA do HPV no LBMEO, do Departamento de Biologia Molecular (DBM), Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN), Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Para a extração do DNA, foi utilizado 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 inseridos em um microtubo de 2mL, contendo 1 mL do Tampão de Extração (Tris/HCL 0,1M; Sacarose 0,32M; MgCl<sub>2</sub>; 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 os fragmentos de CM foram incubados a 57°C por 48 horas em banho maria. Posteriormente, foi transferido 1 mL para um novo microtubo, onde foi também adicionado 1 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1).

Após a homogeneização por 2 minutos, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. Para a etapa de precipitação, foi adicionado 1 mL de álcool absoluto a 0°C, *overnight*. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos. Posteriormente, o álcool absoluto foi desprezado e o DNA foi desidratado na estufa com a temperatura de 60°C. Após a secagem, foi adicionado ao DNA desidratado 200 µL de água Ultrapura Milli-Q estéril.

#### **4.3 Análise da qualidade do DNA extraído**

Como controle endógeno e para avaliar a qualidade do DNA extraído, foram realizadas reações de qPCR do gene da β-globina em todas as amostras de CM, utilizando os *primers* descritos por Bell et al. (Bell et al., 1993). As condições da PCR foram as seguintes: 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final por 5 minutos a 72°C (adaptado de LIMA, 2016; NUNES, 2020).

#### **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 (DE RODA HUSMAN *et al.*, 1995). Como controle positivo, foi utilizado alíquotas do genoma completo de HPV16, clonado no vetor pBR-322, gentilmente cedido pelo Professor Dr. Antonio Carlos de Freitas, do LEMTE, Universidade Federal de Pernambuco.

Em todas as reações, foi utilizado o aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies – Carlsbad, CA). A amplificação do gene L1 foi realizada em um 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 µL de água ultrapura Milli-Q estéril e 2 µL de DNA (100ng/µl). As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos (adaptado de LIMA, 2016; NUNES, 2020).

#### **4.5 Genotipagem do DNA viral**

#### **4.6 Genotipagem do DNA HPV16**

Para a tipificação do HPV16, foi empregado um conjunto de *primers* específicos que amplificam regiões de E6 de HPV16. A amplificação foi realizada utilizando as técnicas de PCR convencional e RT-PCR. A amplificação de um fragmento do gene E6 do HPV16 foi realizada utilizando as seguintes condições: volume final de 25 µL contendo 12,5 µL Taq Pol Master Mix 2x (PROMEGA); 0,1 µL do primer R (50nmol); 0,1 µL do primer F (50nmol); 10,3µ de água ultrapura Milli-Q estéril e 2 µL de DNA (100ng/ µl). Foram utilizadas as seguintes condições para a amplificação: 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 positivo, foram utilizadas diluições do genoma completo de HPV16 clonado no vetor pBR-322.

#### 4.7 Genotipagem do DNA do HPV31

A tipificação viral foi realizada por amplificação de DNA através das reações de PCR tradicional (qPCR). A tipificação, utilizando as estratégias de PCR convencional e RT-PCR. Um conjunto de *primers* específicos, que amplificam regiões de E6 de HPV31, foram utilizados. Os parâmetros que foram utilizados para a amplificação do gene E6 foram: Volume final de 12 µL, contendo 7 µL Taq Pol Master Mix 2x (Promega); 1 µL do primer R (50nmol); 1 µL do primer F (50nmol); 2 µL de água ultrapura Milli-Q estéril e 2 µL de DNA (100ng/ µl). As condições de amplificação foram as seguintes: 1 minutos a 95°C e 40 ciclos com 15 segundos de denaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 61°C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C (adaptado de LIMA,2016; NUNES, 2020).

**Tabela 3:** primer do gene E6 utilizado para tipificação do DNA do HPV 16

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO (pb)	REFERÊNCIA
E6(HPV16)	GAGAAACTGCAATGTTTCAGGAC C (senso)	81pb	De Roda Husman et al., 1995
E6(HPV16)	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTG C (antisenso)	81pb	Peitsaro et al., 2002

**Tabela 4:** primer dos genes E6 utilizado para tipificação do DNA do HPV 31

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	TAMANHO (pb)	REFERÊNCIA
E6(HPV31)	CGTTTTTCGGTTACAGTTTTACAAGC (senso)	72pb	Guimarães,2014
E6(HPV31)	AGCTGGACTGTCTATGACAT (antisenso)	72pb	Guimarães,2014

## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foram realizadas análises estatísticas para avaliar a frequência do HPV16 e 31 nos tumores de mama. A comparação entre os grupos foi realizada usando o teste Exato de *Fisher* e o Qui-quadrado. *P-value* menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado significativo.

## **6 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), para sua apreciação e foi aprovado sobo número 4.506.821.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização das amostras

Foram analisadas 186 (cento e oitenta e seis) 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 CM invasivo (CI) sem outras especificações (SOE). Todos os indivíduos desse estudo são do sexo feminino, com a média de idade de 53,17 anos (27 a 91 anos). Foi observado uma predominância de casos de CI na faixa etária superior aos 55 anos (48,9% do total da amostra estudada).

As amostras de CM também foram categorizadas de acordo com a classificação molecular, a localização anatômica do tumor, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular, grau histológico, expressão dos ER, PR e Ki-67. No que concerne à localização do tumor, o CM foi mais preponderância na mama esquerda (50%), quando comparado à mama direita 49,5%. A classificação histopatológica mais preeminente foi o TNE/SOE, com 80,1% dos casos analisados.

Em relação a classificação molecular, os subtipos luminal A foi mais frequentemente observado (35,7%), seguido pelo luminal B e HER2 positivo, com 20% e 16,8%, respectivamente. Parte significativa das amostras apresentaram índices mitóticos escore (I) 52,8%, indicando que a maior parte dos tumores eram de crescimento lento, seguindo do escore (II) (27,4%) e o escore (III) 17%.

O pleomorfismo nuclear escore (III) foi o mais presente (65,1% dos casos), seguido pelo escore (II) (31,1% dos casos). Na diferenciação tubular, o escore (III) foi mais frequente (68,9%), seguido pelo escore (II) (25,5%). Com relação ao grau histológico, 50,5% apresentaram grau II e 31,4% o grau III. O Ki-67 < 30 correspondeu a 75,5% das amostras analisadas. Quanto aos receptores hormonais, 75,3% das amostras foram RE-positivas, e 62,4% foram PR-positivas. Os valores desses marcadores são importantes para a diferenciação dos tumores em luminal A ou B. A maioria das amostras estudadas não apresentaram invasão angiolinfática (58,5%).

**Tabela 5:** Caracterização das amostras de CM em relação a idade, localização anatômica, grau histológico, classificação histopatológica, classificação molecular, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão angiolinfática e expressão da proteína Ki-67.

	Variável	(%)
Idade	Até _25 Anos	3,8
	26_40 anos	27,4
	41_60 anos	49,5
	Acima 60 anos	19,4
Localização Anatômica	Mama direita	49,5
	Mama esquerda	50
	Ambas as mamas	0,5
Classificação histopatológica	TNE/SOE	80,1
	CDINV	9,1
	CDI	7,5
	CDIISBR	1,1
	CDL	0,5
	CINADER	0,5
	CILOB	0,5
	CDIAPOC	0,5
Classificação molecular	Luminal A	35,7
	Luminal B	20
	Her2 positivo	16,8
	TNBC	12,4
	Não classificado	8,6
	Super Her2	3,2
	Luminal Her2	3,2
Índice mitótico	Escore I	52,8
	Escore II	27,4
	Escore III	17
	Não diferenciado	2,8
Grau de pleomorfismo nuclear	Escore III	65,1

	Escore II	31,1
	Escore I	0,9
	Não diferenciado	2,8
Diferenciação tubular	Escore III	68,9
	Escore II	25,5
	Escore I	4,7
	Não diferenciado	0,9
Grau histopatológico	Grau 2	50,5
	Grau 3	31,4
	Grau 1	10,5
	Não diferenciado	7,6
Ki-67	<30	75,5
	>30	21,5
	Negativo	2,7
Invasão vascular/Angiolinfática	Ausente	58,5
	Presente	25,5
	Não diferenciado	16

**Carcinoma invasivo tipo não específico**, também chamado de carcinoma sem outras especificações (TNE/SOE); **Luminal A** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 < 14%; **Luminal B** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67  $\geq$ 14%; **HER2-** RE- e RP- ; HER2 +; **Índice mitótico**: escore= 1, até sete figuras de mitoses; escore = 2, de oito a 15 figuras de mitoses e escore 3, mais que 15 figuras de mitoses; **Pleomorfismo nuclear**: escore 1, com núcleos são regularmente uniformes (discreto); escore 2, com aumento no tamanho e na variabilidade nuclear (moderado); escore 3, com uma maior variação na forma e no tamanho nuclear (acentuado); **Formaçãotubular**: escore I, a maior parte do tumor forma túbulos (> 75%); escore II, a formação de túbulos é moderada (10% a 75%); escore III, a formação de túbulos é pouca ou nenhuma (< 10%); **Grau Histológico**: I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pouco diferenciado). **Classificação histopatológica**: TNE/SOE- Carcinoma ductal invasivo sem outras especificações; CDI- Carcinoma ductal infiltrante; CDIISBR-Carcinoma ductal infiltrante intermediário de Scarff-Bloom-Richardson; CDINV- Carcinoma ductal invasivo; CDL- Carcinoma mamário invasivo com características ductais e lobulares; CINADER- Carcinoma intraductal de padrão aderente; CILOB- Carcinoma invasivo de padrão morfológico lobular e CDIAPOC- Carcinoma invasivo de padrão apócrino.

## 7.2 Detecção do DNA do HPV nas amostras de CM

Com o intuito de averiguar a qualidade do DNA das amostras extraídas, foram realizadas reações de RT-PCRs para a amplificação do gene  $\beta$ -globina. Foi observada a amplificação do gene da  $\beta$ -globina em todas as amostras inseridas no presente estudo, assinalando uma boa qualidade do DNA extraído de fragmentos de CM parafinados.

Para a detecção do DNA do HPV das amostras de CM, foram utilizados os *primers* degenerados GP5/GP6, que amplificaram fragmentos de 150 pb da região L1. O DNA do HPV foi positivo em 46,2% (86/186) das amostras de câncer da mama. Dentre todas as amostras de CM analisadas no presente estudo, a detecção do DNA do HPV foi mais prevalente no carcinoma ductal invasivo sem outra especificação (47,65%).

Apesar da alta prevalência do HPV em CM ductal invasivo, não houve diferença significativa nos tipos histopatológicos entre os tumores HPV-positivo e HPV-negativos (Tabela 8). Acerca das idades das participantes do nosso estudo, o DNA do HPV predominou nas pacientes com idades de  $41 \leq 60$  anos (50%), embora essa diferença não seja significativa (Tabela 8). Também não foi observada uma diferença significativa nas frequências dos tumores HPV-positivo e HPV-negativos com relação à localização do tumor (Tabela 8).

**Tabela 6:** Análise de associação entre a idade, localização e tipo histopatológico do tumor e a presença do DNA do HPV.

	Nº de casos (%)	HPV positivo (%)	HPV negativo (%)	<i>p</i> -
	186 (100%)	86/186(46,2%)	100/186(53,8%)	
<b>Idade (anos)</b>				
$\leq 25$	7(3,76%)	1(14,28%)	6( 85,71%)	,084
$26 \leq 40$	51(27,42%)	27(47,37%)	24(42,11%)	
$41 \leq 60$	92(49,46%)	46(50%)	46(50%)	
$>60$	36(19,35%)	12(33,33%)	24(66,67%)	
<b>Classificações histopatológicas</b>				
TNE/SOE	149(80,10%)	71(47,65%)	78(52,35%)	
CDI	14(7,53%)	6(42,86%)	8(57,14%)	
CDIISBR	2(1,08%)	2(100%)	0(0%)	
CDINV	17(9,14%)	6(54,55%)	11 (45,45%)	
CDL	1(1%)	0(0%)	1(100%)	

CINADER	1(1%)	0(0%)	1(100%)	
CILOB	1(1%)	1(100%)	0(0%)	
CDIAPOC	1(1%)	0(0%)	1(100%)	
				,45
				0
<b>Mamas</b>				
Mama direita	92(49,73%)	41 (44,57%)	51 (55,43%)	
Mama esquerda	93(52,27%)	45(48,39%)	48 (51,61%)	,81
Ambas	1(1%)	0(0 %)	1(100%)	7

**Classificação histopatológica:** TNE/SOE- Carcinoma ductual invasivo s/ outra especificação/Carcinoma ductual invasivo sem outras especificações; CDI- Carcinoma ductual infiltrante; CDIISBR- Carcinoma ductual infiltrante intermediário de Scarff-Bloom-Richardson; CDINV- Carcinoma ductual invasivo; CDL- Carcinoma mamário invasivo com características ductuais e lobulares; CINADER- Carcinoma intraductual de padrão aderente; CILOB- Carcinoma invasivo de padrão morfológico lobular e CDIAPOC- Carcinoma invasivo de padrão apócrino.

A frequência do DNA do HPV foi analisada quanto à expressão dos ER, PR e Ki-67. Os resultados não evidenciaram uma associação significativa entre a expressão do ER ( $p=0,174$ ), PR ( $p= 0,225$ ) e a presença do HPV nas amostras de CM (Tabela 9). Contudo, foi observado uma associação significativa entre as amostras de CM HPV-positivas e o Ki- 67 $>30$  ( $p=0,035$ ). Em relação à classificação molecular do CM e a presença do DNA do HPV, não houve diferenças significativas entre a infecção viral e os subtipos moleculares luminal A, luminal B, HER-2, TBNC e super HER2 ( $p=0,287$ ) (Tabela 9).

**Tabela 7:** Análise de associação entre expressão dos ER, PR, Ki-67 e a infecção do HPV nas amostras de CM.

	Nº de casos (%)	HPV positivo (%)	HPV negativo (%)	p-
Nº de amostras parafinadas	186 (100%)	86/186 (46,2%)	100/186 (53,8%)	
<b>Classificação molecular</b>				

Luminal A	66(35,68%)	34(51,52%)	32(48,48%)	
Luminal B	37(20%)	16(43,24%)	21(56,76%)	
Her2 positivo	31(16,76%)	10(32,26%)	21(67,74%)	
TNBC	23(12,43%)	10(43,48%)	13(56,52%)	
Não classificado	16(8,65%)	11(68,75%)	5(31,25%)	
Super Her2	6(3,24%)	2(33,33%)	4(66,67%)	
Luminal Her2	6(3,24%)	2(33,33%)	2(66,67%)	
				,287
<b>Expressão RE</b>				
Sim	86(46,24%)	69(80,23%)	71(82,56%)	
Não	100(53,76%)	17(19,77%)	29(17,44%)	,174
<b>Expressão RP</b>				
Sim	86(46,24%)	58(67,44%)	58(58%)	
Não	100(53,76%)	28(32,56%)	42(42%)	,225

<b>Expressão Ki-67</b>			
	<b>HPVpositivo (%)</b>	<b>HPVnegativo (%)</b>	
ki-67<30	73(39,2%)	72(38,7%)	
Ki-67>30	13(6,09%)	28(15%)	
Total	86(46,41%)	100(53,60%)	186
			,035

Teste exato de Fisher Freeman-Halton; RE (receptor de estrogênio); RP (receptor de progesterona) , TNBC (tumor triplo negativo); HER2 (fator de crescimento epitelial humano).

Também não foi encontrada uma associação entre o infiltrado inflamatório ( $p=0,842$ ), índice mitótico ( $p=0,467$ ), grau de pleomorfismo nuclear ( $p=0,639$ ), grau de diferenciação tubular ( $p=0,252$ ), grau histológico ( $p=0,646$ ), invasão nuclear ( $p=0,796$ ) e presença do DNA

do HPV nas amostras de CM (Tabela 10).

**Tabela 8:** Análise de associação entre o infiltrado inflamatório, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, grau de diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão vascular e a infecção do HPV nas amostras de CM.

	Nº de casos (%)	HPV positivo (%)	HPV negativo (%)	p-
<b>Nº de amostras parafinadas</b>	186(100%)	86/186(46,2%)	100/186 (53,8%)	
<b>Infiltrado inflamatório</b>				
IIEA	14(13,20%)	10(71,43%)	4(28,57%)	
IILPE	1(0,94%)	0(0%)	1(100%)	
IINPM	2(1,89%)	1(50%)	1(50%)	
INPA	25(23,58%)	12(48%)	13(52%)	
E	13(12,26%)	8(61,54%)	5(38,46%)	
M	1(0,94%)	0(0%)	1(100%)	
I	2(1,89%)	1(50%)	1(50%)	
A	18(16,98%)	11(61,11%)	7(38,89%)	
L	4(3,77%)	2(50%)	2(50%)	
IITD	2(1,89%)	1(50%)	1(50%)	
ILETM	1(0,94%)	1(100%)	0(0%)	
	23(21,70%)	10(43,48%)	13(56,52%)	,842
<b>INPP</b>				
<b>Índice mitótico</b>				
ND	3(2,83%)	2(66,67%)	1(33,33%)	
I	56(52,83%)	27(48,21%)	29(51,9%)	
II	29(27,36%)	19(65,52%)	10(34,48%)	
III	18(16,98%)	9(50%)	9(50%)	,467
<b>Grau de pleomorfismo nuclear</b>				
ND	3(2,83%)	2(66,67%)	1(33,33%)	
I	1(0,94%)	0(0%)	1(0,94%)	
II	33(31,13%)	16(48,48%)	17(51,51%)	

III	69(65,09%)	39(56,52%)	30(43,48%)	
				,639
<b>Grau de diferenciação tubular</b>				
ND	1(0,94%)	1(100%)	0(0%)	
I	5(4,72%)	1(20%)	4(80%)	
II	27(25,47%)	13(48,15%)	14(51,85%)	
III	73(68,87%)	42(39,62%)	31(60,38%)	
				,252
<b>Grau histológico</b>				
ND	8(7,55 %)	5( 62,5%)	3( 37,5%)	
I	11(10,38%)	4( 36,36%)	7(63,63 %)	
II	53( 50%)	29(54,72 %)	24( 45,28%)	
III	33( 31,13%)	19( 57,58%)	14(42,42 %)	,646
<b>Invasão vascular</b>				
ND	17( 16,03%)	8( 47,06%)	9( 52,94%)	
Presente	27( 24,47%)	14( 51,85%)	13( 48,15%)	
Ausente	62( 58,50%)	35(56,45 %)	27( 43,55%)	,796

**Infiltrado inflamatório:** IIEA: Infiltrado inflamatório no estroma tumoral ausente; IILP E: Infiltrado inflamatório Linfoplasmocitário peritumoral escasso; INPM: Infiltrado neoplásico peritumoral peritoneal moderado; INPA: Inflamação peritoneal ausente; E: Escasso; M: Moderado; I: Intenso; A: Ausente; L: Leve; IITD: Infiltrado inflamatório tumoral discreto; ILETM: Infiltrado linfocitário no estroma tumoral mínimo; INPP: Inflamação perineural presente. **Índice mitótico:** I: afere a velocidade com que as células tumorais expandem e segmentam-se; II e III estão relacionado com a incidência do surgimento de metástase axilares. **Grau de polimorfismo nuclear;** I: Tumor pequenos, regulares e uniformes; II: pontos com aumento moderado do tamanho e da variabilidade; III: Significativa variação; **Grau de diferenciação tubular:** I: Maior parte do tumor (>75%); II: Parte moderada do tumor (10-75%); III: Pouca ou nenhuma parte do tumor (<10%); **Grau histológico:** I: células similares às normais e de crescimento lento; II: células que assemelham-se menos com as normais e tem crescimento moderado; células distintas das normais e de crescimento acelerado; **Invasão vascular:** Presente: houver evidência de invasão do sistema vascular ou linfática e Ausente: Não observou-se evidências de invasão linfática.

### 7.3 Detecção do DNA do HPV16 nas amostras de CM

Do total de amostras de CM positivas para o DNA do HPV, 95% (83/86) são positivas para o HPV16. Não foram encontradas diferenças significativas entre as faixas etárias das

pacientes e a presença do HPV16 nas amostras de CM ( $p=0,147$ ). De forma semelhante, não foram observadas diferenças significativas entre a localização anatômica e a presença do DNA do HPV16 ( $p=0,872$ ). Também não foi encontrada diferença significativa entre a classificação histopatológica dos tumores e a presença do HPV16 ( $p=0,410$ ) (Tabela 11).

**Tabela 9:** Análise de associação entre a idade, localização e tipo histopatológico do tumor e a presença do DNA do HPV16 em CM

	Nº de casos (%)	HPV16 positivo(%)	PV 16negativo (%)	p-
<b>Nº de amostras</b>	186(100%)	83/186(44,62%)	103/186(55,38 %)	
<b>Parafinadas</b>				
<b>Idade (anos)</b>				
≤ 25	7(3,76%)	1(14,29%)	6(85,71%)	
26 ≤ 40	51(27,42%)	25(49,02%)	26(50,98%)	
41 ≤ 60	92(49,46%)	45(48,91%)	47(51,09%)	
>60	36(19,35%)	12(33,33%)	24(66,66%)	,147
<b>Classificação histopatológicos</b>				
TNE/SOE	149(80,11%)	69(46,31%)	80(53,69%)	
CDI	14(7,53%)	5(35,71%)	9(64,29%)	
CDIISBR	2(1,08%)	2(100%)	0(0%)	
CDINV	17(9,14%)	6(35,29%)	11(64,71%)	
CDL	1(0,54%)	0(0%)	1(100%)	
CINADER	1(0,54%)	0(0%)	1(100%)	
CILOB	1(0,54%)	1(100%)	0(0%)	
CDIAPOC	1(0,54%)	0(0%)	1(100%)	,410
<b>Mamas</b>				
Mama direita	92(49,46%)	40(43,48%)	52(56,52%)	,

Mama esquerda 93(50,53%)	43(46,2%)	50(53,76%)	872
--------------------------	-----------	------------	-----

**Classificação histopatológica:** TNE/SOE- Carcinoma ductual invasivo s/ outra especificação/Carcinoma ductual invasivo sem outras especificações; CDI- Carcinoma ductual infiltrante; CDISBR- Carcinoma ductual infiltrante intermediário de Scarff-Bloom-Richardson; CDINV- Carcinoma ductual invasivo; CDL- Carcinoma mamário invasivo com características ductuais e lobulares; CINADER- Carcinoma intraductual de padrão aderente; CILOB- Carcinoma invasivo de padrão morfológico lobular e CDIAPOC- Carcinoma invasivo de padrão apócrino.

Não foram observadas diferenças significativas entre o tipo molecular do CM e a presença do HPV16 ( $p=0,382$ ). De modo similar, não foram observadas diferenças significativas entre a presença do HPV16 e a expressão dos RE ( $p=0,674$ ), PR ( $p=0,225$ ) e o Ki-67 ( $p=0,06$ ) nas amostras analisadas.

**Tabela 10:** Análise de associação entre expressão dos ER, PR, Ki-67 e a infecção do HPV16 nas amostras de CM.

	Nº de casos (%)	HPV 16positivo(%)	HPV 16negativo (%)	p-
<b>Nº de amostras parafinadas</b>	186(100%)	83/186(44,62%)	103/186(55,38%)	
<b>Classificação molecular</b>				
Luminal A	66(35,48%)	31(46,97%)	35(53,03%)	
Luminal B	37(19,89%)	16(43,24%)	21(57,76%)	
Her2 positivo	31(16,66%)	10(32,26%)	21(67,74%)	
TNBC	23(12,37%)	10(43,48%)	13(56,52%)	
Não classificado	16(8,60%)	11(68,75%)	5(31,25%)	
Super Her2	6(3,22%)	2(33,33%)	4(66,67%)	
Luminal Her2	6(3,22%)	2(33,33%)	4(66,67%)	,382
<b>Expressão RE</b>				
	Nº de Amostras	Não	sim	
HPV 16 Negativo	100(53,76%)	29(29%)	71(71%)	
HPV 16 Positivo	86(46,23%)	17(19,77%)	69(80,23%)	,674

<b>Expressão RP</b>			
	Nº de Amostras	Não	sim
HPV 16 Negativo	100(53,76%)	42(42%)	58(58%)
HPV16 Positivo	86(46,23%)	28(37,63%)	58(62,37%)
Total	186(100%)	70(37,63%)	116(62,37%)
			,225
<b>Expressão Ki-67</b>			
	Nº de Amostras	Maior_30	Menor_30
HPV 16 Negativo	103(55,37%)	72(69,90%)	27(30,08%)
HPV16 Positivo	83(44,62%)	69(83,13%)	13(16,87%)
Total	186(100%)	141(75,81%)	40(24,19%)
			,101

Teste exato de Fisher Freeman-Halton; RE (receptor de estrogênio); RP (receptor de progesterona) , TNBC (tumor triplo negativo); HER2 (fator de crescimento epitelial humano).

Não foram observadas diferenças significativas entre infiltrado inflamatório ( $p=0,674$ ), índice mitótico ( $p=0,603$ ), grau de pleomorfismo nuclear ( $p=0,482$ ), grau de diferenciação tubular ( $p=0,252$ ), grau histopatológico ( $p=0,686$ ) e o HPV16 nas amostras de CM analisadas.

**Tabela 11:** Análise de associação entre o infiltrado inflamatório, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, grau de diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão vascular e a infecção do HPV16 nas amostras de CM

	Nº de casos (%)	HPV 16 positivo(%)	HPV16 negativo (%)	p-
Nº de amostras	186(100%)	83/186(44,62%)	103/186(55,38%)	
<b>Parafinadas</b>				
<b>Infiltrado inflamatório (os mais prevalentes)</b>				
INPA	25(13,20%)	10(40%)	15(60%)	
INPP	23(13,44%)	10(43,48%)	13(56,52%)	

L	18(9,68%)	11(61,11%)	7(38,89%)	
IIEA	14(7,53%)	10(71,43%)	4(28,57%)	
<b>Índice mitótico</b>	13(6,99%)	8(61,54%)	5(38,46%)	
E				,674
ND	3/106(2,83%)	1(33,33%)	2(66,66%)	
I	56/106(52,83%)	27(48,21%)	29(51,79%)	
II	29/106(27,36%)	18(62,07%)	11(37,93%)	
III	18(16,98%)	9(50%)	9(50%)	,603
ND	3/106(2,83%)	1(33,33%)	2(66,66%)	
I	1/106(0,94%)	0(0%)	1(100%)	
II	33/106(31,13%)	15(45,45%)	18(54,5%)	
III	69/106(65,09%)	39(56,52%)	30(43,48%)	,482
ND	1/106(0,94%)	0(0%)	1(100%)	
I	5/106(4,72%)	1(20%)	4(80%)	,252
II	27/106(25,47%)	13(48,15%)	14(51,85%)	
III	73/106(68,87%)	41(56,16%)	32(43,84%)	
<b>Grau histopatológico</b>				
ND	8/105(7,62%)	4(50%)	4(50%)	0,69
I	11/105(10,48%)	4(36,36%)	7(63,63%)	
II	53/105(50,48%)	28(52,83%)	25(47,17%)	
III	33/105(31,43%)	19(18,09%)	14(81,90%)	

**Infiltrado inflamatório:** IIEA: Infiltrado inflamatório no estroma tumoral ausente;E: Infiltrado inflamatório Linfoplasmocitário peritumoral escasso; INPA: Inflamação peritoneal ausente; E:Escasso; L: Leve; ;INPP: Inflamação perineural presente. **Índice mitótico:** I: afere a velocidade com que as células tumorais expandem e segmentam-se; II e III estão relacionado com a incidência do surgimento de metástase axilares. **Grau de polimorfismo nuclear;** I: Tumor pequenos, regulares e uniformes; II: pontos com aumento

moderado do tamanho e da variabilidade; III: Significativa variação; **Grau de diferenciação tubular:** I: Maior parte do tumor (>75%); II: Parte moderada do tumor (10-75%); III: Pouca ou nenhuma parte do tumor (<10%); **Grau histológico:**I: células similares às normais e de crescimento lento; II: células que assemelham-se menos com as normais e de crescimento moderado; células distintas das normais e de crescimento acelerado; **Invasão vascular:** Presente: houver evidência de invasão do sistema vascular ou linfática e Ausente: Não observou-se evidências de invasão linfática.

#### 7.4 Detecção do HPV31 em CM

Das 186 amostras analisadas, foi observado a presença do HPV31 em 3,8% (7/186). Não foram observadas diferenças significativas entre a presença do HPV31 e a idade ( $p=0,330$ ), localização do tumor ( $p=1,0$ ) e o tipo histopatológico ( $p=0,623$ ).

**Tabela 12.** Frequência do HPV 31 relacionada com a idade, classificação histopatológica e a localização do tumor em carcinomas mamários.

	Nº de casos (%)	HPV 31 positivo(%)	HPV31 negativo (%)	p-
<b>Nº de amostras</b>	186(100%)	7/186(3,8%)	179/186(96,2%)	
<b>Parafinadas</b>				
<b>Idade (anos)</b>				
≤ 25	7(3,76%)	0(%)	7(100%)	
26 ≤ 40	51(27,42%)	4(7,84%)	47(92,16%)	
41 ≤ 60	93(50%)	3(3,22%)	90(96,77%)	
>60	36(19,35%)	0(%)	36(100%)	
				,330
<b>Classificação histopatológicos</b>				
TNE/SOE	149(80,10%)	6(3,22%)	143(97,77%)	
CDI	14(7,53%)	1(7,14%)	13(92,86%)	
CDIISBR	2(1,07%)	0(%)	2(100%)	
CDINV	17(13,14%)	0(%)	17(100%)	
CDL	1(0,54%)	0(%)	1(100%)	
CINADER	1(0,54%)	0(%)	1(100%)	
CILOB	1(0,54%)	0(%)	1(100%)	

CDIAPOC	1(1%)	0(0%)	1(100%)	,623
<b>Mamas</b>				
Mama direita	92(49,46%)	3(3,26%)	89(96,74%)	1,000
Mama esquerda	93(50,53%)	4(48,39%)	89(51,61%)	

**Classificação histopatológica:** TNE/SOE- Carcinoma ductual invasivo s/ outra especificação/Carcinoma ductual invasivo sem outras especificações; CDI- Carcinoma ductual infiltrante; CDIISBR- Carcinoma ductual infiltrante intermediário de Scarff-Bloom-Richardson; CDINV- Carcinoma ductual invasivo; CDL- Carcinoma mamário invasivo com características ductuais e lobulares; CINADER- Carcinoma intraductual de padrão aderente; CILOB- Carcinoma invasivo de padrão morfológico lobular e CDIAPOC- Carcinoma invasivo de padrão apócrino.

Não foram encontradas diferenças significativas entre o tipo molecular do CM e a presença do HPV31 ( $p=0,269$ ). Também não foram observadas diferenças significativas entre a presença do HPV31 e a expressão dos RE ( $p=1,00$ ), PR ( $p=1,00$ ) e o Ki-67 ( $p=0,212$ ) nas amostras de CM analisadas nesse estudo.

**Tabela 13.** Análise de associação entre expressão dos ER, PR, Ki-67 e a infecção do HPV31 nas amostras de CM.

	Nº de casos (%)	HPV 31positivo(%)	HPV 31negativo (%)	p-
Nº de amostras	186(100%)	86/186(46,2%)	100/186(53,8%)	
<b>Parafinadas</b>				
<b>Classificação molecular</b>				
	<b>HPV 31positivo (%)</b>	<b>HPV 31negativo (%)</b>		
Luminal A	6(3,22%)	60(32,26%)		
Luminal B	0(%)	37(19,89%)		
Her2 positivo	0(%)	31(16,67%)		
TNBC	1(0,54%)	22(11,83%)		
Não classificado	0(%)	16(8,60%)		
Super Her2	0(%)	6(3,22%)		

LuminalHer2	0(%)	6(3,22%)	
Total	7(3,76%)	178(95,70)	
			,269
<b>Expressão RE</b>			
<b>HPV 31positivo (%)</b>		<b>HPV 31negativo (%)</b>	
Sim	5(46,24%)	135(67,44%)	
Não	2(53,76%)	44(32,56%)	1,000
<b>Expressão RP</b>			
<b>HPV 31positivo (%)</b>		<b>HPV 31negativo (%)</b>	
Sim	4(2,15%)	112(60,21%)	
Não	3(1,61%)	67(36,02%)	
Total	7(3,76%)	179(96,23%)	1,000

<b>Expressão Ki-67</b>			
<b>HPV 31positivo (%)</b>		<b>HPV 31negativo (%)</b>	
Sim	5(2,76%)	136(75,14%)	>30
Não	1(0,55%)	39(21,55%)	< 30
Total	6(3,31%)	175(96,68%)	
			,212

Teste exato de Fisher Freeman-Halton; RE (receptor de estrogênio); RP (receptor de progesterona) , TNBC (tumor triplo negativo); HER2 (fator de crescimento epitelial humano). Dentre as 7 amostras positivas para o HPV 31, a mais prevalente foia INPAcom2,83% (3/106).

De modo semelhante, não foram observadas diferenças significativas entre infiltrado inflamatório ( $p=0,896$ ), grau de pleomorfismo nuclear ( $p=0,482$ ), grau de diferenciação tubular ( $p=0,171$ ), grau histopatológico ( $p=0,071$ ) e o HPV31 nas população estudada. Contudo, uma associação entre o HPV31 e o índice mitótico ( $p=0,603$ ) foi

observada no presente estudo.

**Tabela 14.** Análise de associação entre CM HPV31-positivo e o infiltrado inflamatório, índice mitótico, grau de polimorfismo nuclear, grau de diferenciação tubular, grau histopatológico e invasão vascular.

<b>Infiltrado inflamatório</b>					
	<b>Nº de casos (%)</b>	<b>HPV31positivo(%)</b>	<b>HPV31 negativo (%)</b>	<b>p-</b>	
IEEA	14(13,21%)	0(%)	14(100%)	,896	
IILPE	1(0,94%)	0(%)	1(100%)		
IINPM	2(1,88%)	0(%)	2(100%)		
INPA	25(23,58%)	3(12%)	22(88%)		
E	13(12,26%)	1(7,69%)	12(92,31%)		
M	1(0,94%)	0(%)	1(100%)		
I	2(1,88%)	0(%)	2(100%)		
A	18(16,98%)	1(5,55%)	17(94,44%)		
L	4(3,77%)	0(%)	4(100%)		
IITD	2(1,88%)	0(%)	2(100%)		
ILETM	1(0,94%)	0(%)	1(100%)		
INPP	23(21,70%)	1(4,35%)	22(95,65%)		
<b>Índice mitótico</b>					
ND	3(2,837%)	1(33,33%)	2(66,67%)		,047
I	56(52,83%)	1(1,76%)	55(98,21%)		
II	29(27,36%)	3(10,34%)	26(89,66%)		
III	18(16,98%)	1(5,55%)	17(94,44%)		
<b>Grau de polimorfismo nuclear</b>					
ND	3(2,837%)	1(33,33%)	2(66,67%)	,171	
I	1(0,94%)	0(%)	1(100%)		
II	33(31,13%)	2(1,89%)	31(98,11%)		
III	69(65,09%)	3(4,35%)	66(95,65%)		
<b>Grau de diferenciação tubular</b>					

ND	1(0,95%)	1(100%)	0(%)	
I	5(4,76%)	0(%)	5(100%)	
II	27(25,71%)	2(7,41%)	25(92,59%)	,071
III	73(69,52%)	3(4,10%)	70(66,67%)	
<b>Grau histológico</b>				
ND	8(96,27%)	2(96,27%)	6(96,27%)	
I	11(96,27%)	0(96,27%)	11(96,27%)	
II	53(96,27%)	2(96,27%)	51(96,27%)	,140
III	33(96,27%)	2(96,27%)	31(96,27%)	
<b>Invasão vascular</b>				
ND	17(16,04%)	1(5,88%)	16(94,12%)	
				1,000
Presente	27(25,47%)	1(3,70%)	26(96,27%)	
Ausente	62(58,49%)	4(6,45%)	58(93,54%)	

**Infiltrado inflamatório:** IIEA: Infiltrado inflamatório no estroma tumoral ausente; IILP E: Infiltrado inflamatório Linfoplasmocitário peritumoral escasso; INPM: Infiltrado neoplásico peritumoral peritoneal moderado; INPA: Inflamação peritoneal ausente; E: Escasso; M: Moderado; I: Intenso; A: Ausente; L: Leve; IITD: Infiltrado inflamatório tumoral discreto; ILETM: Infiltrado linfocitário no estroma tumoral mínimo; INPP: Inflamação perineural presente. **Índice mitótico:** I: afere a velocidade com que as células tumorais expandem e segmentam-se; II e III estão relacionado com a incidência do surgimento de metástase axilares. **Grau de polimorfismo nuclear;** I: Tumor pequenos, regulares e uniformes; II: pontos com aumento moderado do tamanho e da variabilidade; III: Significativa variação; **Grau de diferenciação tubular:** I: Maior parte do tumor (>75%); II: Parte moderada do tumor (10-75%); III: Pouca ou nenhuma parte do tumor (<10%); **Grau histológico:** I: células similares às normais e de crescimento lento; II: células que assemelham-se menos com as normais e tem crescimento moderado; células distintas das normais e de crescimento acelerado; **Invasão vascular:** Presente: houver evidência de invasão do sistema vascular ou linfática e Ausente: Não observou-se evidências de invasão linfática.

## 7.5 Coinfecção HPV16 e HPV31

Quanto à coinfecção, foram observadas 1,6% (3/186) do total de amostras de CM analisadas estavam coinfectadas pelos genótipos HPV16 e HPV31.

## 8 DISCUSSÃO

Nosso grupo de pesquisa foi pioneiro em investigar a possível presença do HPV nas amostras de carcinomas mamários de pacientes em tratamento no estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Em um estudo pregresso, observamos que 60% (60/100) das amostras foram HPV positivas (Nunes,2020). No presente estudo, nossos resultados demonstraram que a prevalência de HPV nos tumores mamários continua relativamente elevada, 46,2% (86/186), mesmo havendo um incremento no número de amostras. Similarmente, estudamosa possível presença dos HPVs de alto risco 16, 31 nos tumores, bem como uma provável coinfeção.

No presente estudo, não foram observadas associações significativas entre CM HPV-positivos e a idade, tipo histopatológico, tipo molecular, localização anatômica do tumor, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular, grau histológico, expressão dos ER, PR. No entanto, foi observada uma associação entre o Ki-67>30 e tumores HPV- Positivos. Além disso, também foi observada uma associação entre o HPV31 e o índice mitótico em CM HPV31- positivos. No total, foi observada a presença de coinfeção dos genótipos HPVs16 e 31 em 1,6% das amostras de CM.

As infecções persistentes causadas por HPV estão associadas a diversos tipos de câncer. Isso ocorre porque, além de regular o processo de replicação do vírus, as oncoproteínas virais são capazes de alterar a expressão de genes do hospedeiro, culminandona desregulação das vias de crescimento e morte celular (DELLA FERA et al., 2021; MCBRIDE, 2013). Nesse cenário, diversos grupos de pesquisa têm investigado o papel da etiologia do HPV em outros tipos de tumores, em especial no carcinoma mamário (AGUAYO et al., 2011a; GUPTA et al., 2022, 2022; HAGSHENAS et al., 2016; HENNIG et al., 1999; SALMAN et al., 2017).

Os resultados do presente estudo corroboram com pesquisas preexistentes, realizadas em diversos países, que demonstraram desfechos semelhantes (ALINEZHADI et al., 2022; CAVALCANTE et al., 2018; CHOI et al., 2016; DE CAROLIS et al., 2019; EL-SHEIKH et al., 2021; ESLAMIFAR et al., 2015; FU et al., 2015; GEBREGZABHER et al., 2021; GOLROKH MOFRAD et al., 2021; HABYARIMANA et al., 2018; HERRERA-GOEPFERT et al., 2011b, 2013; KHAN et al., 2008a; LAWSON et al., 2015; LI; DING; ZHAI, 2015; MORRIS, 2005; NAGI et al., 2021; PIANA et al., 2014; SALMAN et al., 2017; WIDSCHWENDTER et al.,2004). Por exemplo, na Inglaterra, 42% das amostras foram HPV positivas (SALMAN et al.,2017).

No Iraque, o material genético do HPV foi detectado em 46,5% dos tumores mamários analisados (ALI; AL-ALWAN; AL-ALWANY, 2014). Resultados análogos foram encontrados em estudos realizados Ruanda, onde 46,81% dos foram positivos para o HPV (HABYARIMANA et al., 2018). Nossos resultados também concordam com os estudos feitos por Glenn e colaboradores (2012), na Austrália, que obtiveram uma prevalência do HPV em 50% dos tumores de mama (GLENN et al., 2012). Da mesma forma, Yu e colaboradores (1999) realizaram um estudo de detecção do HPV em mulheres com câncer de mama, na China, e observaram uma prevalência de 43% (YU et al., 1999).

Nos EUA, de Villiers e colaboradores (2005) detectaram o DNA do HPV em 86% da população estudada (DE VILLIERS et al., 2005). Estudos latino-americanos também demonstraram a prevalência do HPV em amostras de carcinomas mamários. de León DC e colaboradores (2009) no México, detectou o DNA do HPV em 29% dos tumores estudados (LEÓN et al., 2009). Suárez e colaboradores em estudos realizados na Argentina observaram uma prevalência do HPV em 26% das amostras (PEREIRA SUAREZ et al., 2013).

Resultado similar também foi observado em estudos conduzidos com a população brasileira (DAMIN et al., 2004). Os estudos realizados com a população do Nordeste brasileiro demonstraram uma prevalência do HPV em carcinomas mamários similares à encontrada em nosso estudo, onde a prevalência do HPV em tumores mamários foi de 49,5% e 46,7% das amostras do Ceará e Pernambuco, respectivamente (CAVALCANTE et al., 2018; GONÇALVES, 2016).

Em relação ao HPV16, um percentual de 44,6% (86/186) das amostras foram positivas. A prevalência do HPV16 também foi observada em estudo realizado por Islam e colaboradores na Índia (2017), onde esse genótipo foi observado em 69% (120/174) das amostras estudadas (ISLAM; CHAKRABORTY; PANDA, 2020). Entretanto, nosso resultado foi divergente dos observados por Wang e colaboradores (2016), em um estudo realizado na China, que observaram uma prevalência de 15,75% (23/146) (WANG et al., 2016).

Quanto ao HPV31, foi detectada a presença desse genótipo viral 3,8% (7/186) do total de amostras analisadas. Nosso resultado concorda com os observados por Herrera-Goepfert e colaboradores (2011) que encontraram 2,86 (2/70) (HERRERA-GOEPFERT et al., 2011<sup>a</sup>). A cerca da idade, o DNA do HPV e do HPV16 predominou nas amostras de pacientes com idades de  $41 \leq 60$  anos, corroborando com estudos

prévios(CAVALCANTE et al.,2018; SALMAN et al., 2017). Todavia, os nossos resultados foram discordantes de Gonçalves(2016), que verificou em seus estudos uma prevalência do HPV em amostras de pacientes com idade superior aos 60 anos. A distribuição do HPV 31 foi mais prevalente na faixa etária entreos  $26 \leq 40$  anos, correspondendo a 2,15% (4/186) dos tumores estudados. Não foram observadas associações entre a presença do HPV, HPV16 e/ou HPV31 e a idade no presente estudo.

Das 86 amostras HPV-positivas, 80,23% expressam RE e 67,44% expressam o RP. Resultados similares foram observados por Morato (2019). Das 83 amostras HPV16-positivas,80,72% expressam o RE (67/83) e 67% (56/83) expressam o RP nas amostras analisadas. Estes resultados corroboram com os estudos conduzidos na Noruega, por Hennig e colaboradores (1999) (HENNIG et al., 1999). No que se refere aos tumores HPV31- positivos, a expressão do RE foi observada em 71,4% (5/7) e RP 57% (4/7).

Não foi observada associação entre tumores HPV/HPV16-positivos e a expressão dos RE e PR. No presente estudo, foram comparadas amostras de CM HPV-positivas vs CM HPV- Negativas. No entanto, não foram comparadas amostras CM-HPVpositivas vs controles (livres de processo tumoral). É possível supor que: i) Exista uma diferença nas frequências de HPV em casos e controles do CM; ii) existam diferença na expressão do RE e PR na presença ou ausência do HPV em tecido mamário.

Dessa forma, futuro estudos devem ser realizados com controles livres de processo tumoral para determinar o papel do HPV na carcinogênese mamária e na expressão dos ER e PR. Na amostra estudada, a expressão do Ki-67  $>30$  foi significativa em CM HPV positivos. Estudos prévios também tem mostrado uma alteração na expressão do Ki-67 CM-HPV- positivos, sugerindo que, na presença de genomas virais, a expressão dessa proteína aumenta (EL-SHINAWI et al., 2016; TAHA MOHAMED et al., 2017). Contudo, não foram observadas associações significativas do HPV16 ou HPV31 e o CM.

Acerca do grau histológico, o DNA do HPV foi mais prevalente nas amostras de câncer de mama grau II 27,61% (29/105). Esse resultado é semelhante ao do estudo realizado por Damin e colaboradores (2004) (DAMIN et al., 2004). O HPV 16 foi mais prevalente em tumores grau II 52,83% (28/53), esse resultado diverge de outros estudos, onde a maior prevalência observado foi do grau III (HABYARIMANA et al., 2018; KROUPIS et al., 2006) O grau II foi o mais prevalente entre os tumores HPV31 positivos. Esses resultado corrobora com os encontrados por Habyarimana e colaboradores(2018) (HABYARIMANA et al., 2018).

No que concerne à classificação molecular dos tumores, o Luminal A foi o mais prevalente correspondendo a 35,48% (66/186) das amostras analisadas. Esse resultado corrobora com outros estudos (DE CAROLIS et al., 2019; NUNES 2020). Das 66 amostras HPV-positivas e Luminal A, em 46,97% (31/66) detectamos a presença do genótipo 16. Nosso resultado concordou com os encontrados por Habyarimana e colaboradores (2018) e discorda com o observador por Islam e colaboradores (2018) HABYARIMANA et al., 2018; ISKAM; CHAKRABORTY; PANDA, 2020).

Com relação ao HPV 31, nós observamos sua presença em 3,22 (6/66) dos tumores Luminais A, corroborando com Habyarimana e colaboradores (2018) (HABYARIMANA et al., 2018). O presente estudo observou o aumento na expressão do Ki-67 > 30 e do índice mitótico em CM HPV-positivos. Além disso, nós observamos uma alta frequência do DNA do HPV em CM de mulheres residentes no Estado da Paraíba. Esses dados são importantes, pois demonstram que a mama é um possível nicho de atuação do vírus.

Essa hipótese é relevante, pois a região Nordeste do Brasil existe uma elevada prevalência de infecção pelo HPV16 e HPV31, e sua presença no tecido mamário sugere que o DNA do HPV pode ter sido transportado do sítio inicial da infecção para o tecido mamário por via hematológica ou vesículas extracelulares (CONCEIÇÃO GOMES NASCIMENTO et al., 2021; DE CAROLIS et al., 2019; DONG et al., 2002; G. DE LIMA et al., 2016; SIMÕES et al., 2012). Dessa forma, se faz necessário mais estudos para que compreender melhor o transporte do DNA viral até a mama e seu possível papel na transformação celular.

## **9 CONCLUSÃO**

O genoma do HPV foi detectado em 48,38% (90/186) em amostras de CM de mulheres residentes no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. Dentre essas amostras CM HPV-positivas, o genótipo mais prevalente foi o HPV16, detectado em 44,62% (83/186). O HPV31 foi detectado 3,8% (7/186) do total de amostras de CM. A presença de coinfeção pelos genótipos 16 e 31 foi observada em 1,62% (3/186) dos tumores de mama. Em pacientes com CM HPV-positivas, foi observada uma associação entre KI-67 > 30 e o índice mitótico. Dessa forma futuros estudos devem esclarecer o papel do HPV na tumorigênese e/ou agressividade tumoral.

## 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, ago. 2010.

AFZAL, S. et al. Interrelated Oncogenic Viruses and Breast Cancer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, 2022.

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.

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.

ALI, S. H. M.; AL-ALWAN, N. A. S.; AL-ALWANY, S. H. M. Detection and genotyping of human papillomavirus in breast cancer tissues from Iraqi patients. **Eastern Mediterranean Health Journal = La Revue De Santé De La Méditerranée Orientale = Al-Majallah Al-Şihḥīyah Li-SharqAl-Mutawassiṭ**, v. 20, n. 6, p. 372–377, jun. 2014.

ALINEZHADI, M. et al. Detection of High-Risk Human Papillomavirus DNA in Invasive Ductal Carcinoma Specimens. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 23, n. 9, p. 3201–3207, 1 set. 2022.

ARALDI, R. P. et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 106, p. 1537–1556, out. 2018.

ATIQUE, S. et al. Viral warts (Human Papilloma Virus) as a potential risk for breast cancer among younger females. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, v. 144, p. 203–207, jun. 2017.

BADARACCO, G. et al. Human papillomavirus in head and neck carcinomas: prevalence, physical status and relationship with clinical/pathological parameters. **Anticancer research**, v. 20, n. 2B, p. 1301–1305, abr. 2000.

BAKHTIYRIZADEH, S. et al. Almost Complete Lack of Human Cytomegalovirus and Human papillomaviruses Genome in Benign and Malignant Breast Lesions in Shiraz, Southwest of Iran. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 18, n. 12, p. 3319–3324, 29 dez. 2017.

BALCI, F. L.; URAS, C.; FELDMAN, S. M. Is human papillomavirus associated with breast cancer or papilloma presenting with pathologic nipple discharge? **Cancer Treatment and Research Communications**, v. 19, p. 100122, 2019.

BALTZELL, K. et al. Limited evidence of human papillomavirus in [corrected] breast tissue using molecular in situ methods. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1212–1220, 1 mar. 2012.

BODAGHI, S. et al. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5428–5434, nov. 2005.

BRITT, K. L.; CUZICK, J.; PHILLIPS, K.-A. Key steps for effective breast cancer prevention. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 8, p. 417–436, ago. 2020.

BUYS, S. S. et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. **Cancer**, v. 123, n. 10, p. 1721–1730, 15 maio 2017.

CALDERON, G. et al. Human Papillomavirus, Cytomegalovirus Infection and P16 Staining in Breast Tumors from Peruvian Women. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 23, n. 5, p. 1571–1576, 1 maio 2022.

CAVALCANTE, J. R. et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 73, p. e465, 18 out. 2018.

CHEN, H. et al. Viral infections and colorectal cancer: a systematic review of epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 1, p. 12–24, 1 jul. 2015.

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.

CONCEIÇÃO GOMES NASCIMENTO, K. et al. Detection of Human Papillomavirus DNA in Paired Peripheral Blood and Cervix Samples in Patients with Cervical Lesions and Healthy Individuals. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 21, p. 5209, jan. 2021.

CORBEX, M. et al. Prevalence of papillomaviruses, polyomaviruses, and herpesviruses in triple-negative and inflammatory breast tumors from algeria compared with other types of breast cancer tumors. **PloS One**, v. 9, n. 12, p. e114559, 2014.

DAMIN, A. P. S. et al. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 84, n. 2, p. 131–137, mar. 2004.

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, p. 860, 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–R11, 2005.

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.

DELLA FERA, A. N. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 321, fev. 2021.

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.

DONG, S. M. et al. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Carcinoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 11, n. 1, p. 3–6, 1 jan. 2002.

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. , v. 23, p. 297–313, 2007.

DOOSTI, M. et al. Lack of Evidence for a Relationship between High Risk Human Papillomaviruses and Breast Cancer in Iranian Patients. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 17, n. 9, p. 4357–4361, 2016.

D'SOUZA, G. et al. Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 19, p. 1944–1956, 2007.

EL-SHEIKH, N. et al. Assessment of Human Papillomavirus Infection and Risk Factors in Egyptian Women With Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 15, p. 1178223421996279, 2021.

EL-SHINAWI, M. et al. Inflammatory and Non-inflammatory Breast Cancer: A Potential Role for Detection of Multiple Viral DNAs in Disease Progression. **Annals of Surgical Oncology**, v. 23, n. 2, p. 494–502, 1 fev. 2016.

ESLAMIFAR, A. et al. Assessment of the Association between Human Papillomavirus Infection and Breast Carcinoma. **Iranian Journal of Pathology**, v. 10, n. 1, p. 41–46, 2015.

FAKHRY, C.; GILLISON, M. L. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 17, p. 2606–2611, 10 jun. 2006.

FAN, S. et al. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5418, p. 1354–1356, 21 maio 1999.

FASANO, J.; MUGGIA, F. Breast cancer arising in a BRCA-mutated background: therapeutic implications from an animal model and drug development. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 20, n. 4, p. 609–614, abr. 2009.

FISCHER, M. et al. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2603, 1 jun. 2017.

FREGA, A. et al. Evaluation of E6 and E7 mRNA expression in HPV DNA positive

breast cancer. **European Journal of Gynaecological Oncology**, v. 33, n. 2, p. 164–167, 2012.

FU, L. et al. Association of human papillomavirus type 58 with breast cancer in Shaanxi province of China. **Journal of Medical Virology**, v. 87, n. 6, p. 1034–1040, jun. 2015.

G. DE LIMA, E. et al. Putative Mechanisms of Viral Transmission and Molecular Dysregulation of Mammary Epithelial Cells by Human Papillomavirus: Implications for Breast Cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 16, n. 7, p. 650–659, 1 ago. 2016.

GEBREGZABHER, E. et al. Detection of High- and Low-Risk HPV DNA in Archived Breast Carcinoma Tissues from Ethiopian Women. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2021, p. 2140151, 2021.

GIULIANO, A. E.; EDGE, S. B.; HORTOBAGYI, G. N. Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 25, n. 7, p. 1783–1785, 1 jul. 2018.

GLASER, S. L.; HSU, J. L.; GULLEY, M. L. Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 13, n. 5, p. 688–697, maio 2004.

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. 2012.

GOLROKH MOFRAD, M. et al. Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients. **Virology Journal**, v. 18, n. 1, p. 25, 22 jan. 2021.

GROVES, Ian J.; COLEMAN, Nicholas. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. **The journal of pathology**, v.235,n.4,p.527-538,2015.

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.

GUPTA, I. et al. Presence of high-risk HPVs, EBV, and MMTV in human triple-

negative breast cancer. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 11, p. 4457–4466, 2 nov. 2021.

GUPTA, I. et al. Incidence of HPVs, EBV, and MMTV-Like Virus in Breast Cancer in Qatar. **Intervirolgy**, v. 65, n. 4, p. 188–194, 2022.

HABYARIMANA, T. et al. Detection of human papillomavirus DNA in tumors from Rwandese breast cancer patients. **Breast Cancer (Tokyo, Japan)**, v. 25, n. 2, p. 127–133, mar. 2018.

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.

HAMMOND, M. E. H. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 7, p. e48-72, jul. 2010.

HEDAU, S. et al. Breast cancer and human papillomavirus infection: no evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. **BMC cancer**, v. 11, p. 27, 20 jan. 2011.

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, jan. 1999.

HERNÁNDEZ, J. E. L. et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Medellín, Colombia. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 12, n. 1, p. 11, 17 abr. 2014.

HERRERA-GOEPFERT, R. et al. High-risk human papillomavirus in mammary gland carcinomas and non-neoplastic tissues of Mexican women: no evidence supporting a cause and effect relationship. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 20, n. 2, p. 184–189, abr. 2011a.

HERRERA-GOEPFERT, R. et al. High-risk human papillomavirus in mammary gland carcinomas and non-neoplastic tissues of Mexican women: no evidence supporting a cause and effect relationship. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 20, n. 2, p. 184–189, abr. 2011b.

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.

HERRERA-ROMANO, L. et al. Absence of human papillomavirus sequences in epithelial breast cancer in a Mexican female population. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 3, p. 1515–1517, set. 2012.

HSU, C.-R. et al. Possible DNA viral factors of human breast cancer. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 498–512, 13 abr. 2010

Hsu, C.-R.; Lu, T.-M.; Chin, L.W.; Yang, C.-C. Possible DNA Viral Factors of Human Breast Cancer. **Cancers** 2010, 2, 498–512

**INCA**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/apresentacao>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

ISLAM, MD. S.; CHAKRABORTY, B.; PANDA, C. K. Human papilloma virus(HPV) profiles in breast cancer:future management. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 10, p. 650, maio 2020.

ISLAM, S. et al. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. **PloS One**, v. 12, n. 2, p. e0172760, 2017.

ISLAM, M.S.; Chakraborty, B.; Panda, C.K. Human Papilloma Virus (HPV) Profiles in Breast Cancer: Future Management. **Ann. Transl. Med.** 2020, 8, 650.

JEANNOT, E. et al. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. **The Journal of Pathology. Clinical Research**, v. 2, n. 4, p. 201–209, out. 2016.

JOSHI, D.; BUEHRING, G. C. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 1, p. 1–15, ago. 2012.

KARIMI, M. et al. No Significant Association between Human Papillomavirus and

Breast Cancer, Sanandaj, Iran. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 17, n. 10, p. 4741–4745, 1 out. 2016.

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. 2008a.

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, 5 ago. 2008b.

KLEIN, F.; AMIN KOTB, W. F. M.; PETERSEN, I. Incidence of human papilloma virus in lungcancer. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 65, n. 1, p. 13–18, jul. 2009.

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.

KUDELA, E. et al. HPV-Associated Breast Cancer: Myth or Fact? **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 12, p. 1510, 9 dez. 2022.

LANGER, C. J. Exploring biomarkers in head and neck cancer. **Cancer**, v. 118, n. 16, p. 3882–3892, 15 ago. 2012.

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, 22 set. 2009.

LAWSON, J. S. et al. Human Papilloma Virus Identification in Breast Cancer Patients with Previous Cervical Neoplasia. **Frontiers in Oncology**, v. 5, p. 298, 2015.

LEE, A.; MOON, B. I.; KIM, T. H. BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 40, n. 2, p. 114–121, mar. 2020.

LEÓN, D. C. DE et al. Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. **BMC Cancer**, v. 9, n. 1, p. 26, 22 jan. 2009.

LI, J.; DING, J.; ZHAI, K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136050, 2015.

LIU, Y. et al. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7297–7307, set. 1999.

MALDONADO-RODRÍGUEZ, E. et al. Presence of Human Papillomavirus DNA in Malignant Neoplasia and Non-Malignant Breast Disease. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 44, n. 8, p. 3648–3665, 13 ago. 2022.

MALHONE, C.; LONGATTO-FILHO, A.; FILASSI, J. R. Is Human Papilloma Virus Associated with Breast Cancer? A Review of the Molecular Evidence. **Acta Cytologica**, v. 62, n. 3, p. 166–177, 2018.

MARETI, E. et al. Human papillomavirus in breast cancer of patients with cervical intraepithelial neoplasia or cervical cancer history. A systematic review and meta-analysis. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 26, n. 3, p. 707–713, 2021.

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

METWALLY, S. A. et al. Presence of HPV, EBV and HMTV Viruses Among Egyptian Breast Cancer Women: Molecular Detection and Clinical Relevance. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2327–2339, 2021.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, ago. 2010.

MORK, J. et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **The New England journal of medicine**, v. 344, n. 15, p. 1125–1131, 12 abr. 2001.

MORRIS, B. J. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 43, n. 11, p. 1171–1177, 2005.

MOSTAFAEI, S. et al. Simultaneous Effects of Viral Factors of Human Papilloma Virus and Epstein-Barr Virus on Progression of Breast and Thyroid Cancers: Application of Structural

Equation Modeling. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 21, n. 5, p. 1431–1439, 1 maio 2020.

NAGI, K. et al. High-risk human papillomaviruses and Epstein-Barr virus in breast cancer in Lebanese women and their association with tumor grade: a molecular and tissue microarray study. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 308, 10 jun. 2021.

NGAN, C. et al. Early Human Papilloma Virus (HPV) Oncogenic Influences in Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 9, p. 93–97, 2015.

OLIVEIRA, E. S. D. et al. High Frequency of Epstein-Barr Virus and Absence of Papillomavirus in Breast Cancer Patients from Brazilian Northeast. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 23, n. 7, p. 2351–2359, 1 jul. 2022.

PAO, C. C. et al. Detection of human papillomavirus mRNA and cervical cancer cells in peripheral blood of cervical cancer patients with metastasis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 15, n. 3, p. 1008–1012, mar. 1997.

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, p. e61613, 25 abr. 2013.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, ago. 2000.

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

REZAEI, H.; RASSI, H.; MANSUR, F. N. Investigation of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Human Papilloma Virus Genotypes in Iranian Breast Cancer. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 36, n. 3, p. 124–128, jun. 2017.

SALMAN, N. A. et al. Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: AUK based Study. **Scientific Reports**, v. 7, p. 43591, 27 fev. 2017.

SHER, G. et al. Prevalence and Type Distribution of High-Risk Human Papillomavirus

(HPV) in Breast Cancer:AQatar Based Study. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1528, 10 jun. 2020.

SHUKLA, S. et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 130, n. 3, p. 222–233, set. 2009.

SIGAROODI, A. et al. Human Papillomavirus Is Associated with Breast Cancer in the North Part of Iran, Human Papillomavirus Is Associated with Breast Cancer in the North Part of Iran. **The Scientific World Journal, The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012, p. e837191, 1 abr. 2012.

SIMÕES, P. W. et al. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: a systematic review. **International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society**, v. 22, n. 3, p. 343–347, mar. 2012.

SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 18, n. 10, p. 663–672, out. 2021.

STRUMYLAITĖ, L.; MECHONOŠINA, K.; TAMAŠAUSKAS, Š. Environmental factors and breast cancer. **Medicina**, v. 46, n. 12, p. 867, dez. 2010.

SNELLENBERG, SUZANNE et al. Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cancer cervical lesions determined with the LUMINEXr xMAP™ system. **Virology**, v.422,n.2,p.357-365,2012.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAHAMOHAMED, H. et al. Inflammatory breast cancer: Mixed viral infections within carcinoma tissues and the expression of Ki-67 proliferation marker. 2017.

USMAN, M. et al. Breast Cancer Risk and Human Papillomavirus Infection: A Bradford Hill Criteria Based Evaluation. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 22, n. 4, p. e200122200389, 2022.

- VAN DOORSLAER, K. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 8, p. 989–990, 2018.
- VIEIRA, V. C. et al. Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNAdeminase APOBEC3B. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e02234-14, 23 dez. 2014.
- 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, dez. 2016.
- WANG, T. et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 1, p. 48–55, mar. 2012a.
- WANG, T. et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 29, n. 1, p. 48–55, mar. 2012b.
- 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. 2004.
- WOLFF, A. C. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997–4013, nov. 2013.
- 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.
- WU, M.-H. et al. Human papillomavirus E2 protein associates with nuclear receptors to stimulate nuclear receptor- and E2-dependent transcriptional activations in human cervical carcinoma cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 2, p. 413–425, 2007.

YIANNAKOPOULOU, E. Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. **Cellular Oncology (Dordrecht)**, v. 37, n. 1, p. 1–8, fev. 2014.

YU, Y. et al. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. **Anticancer Research**, v. 19, n. 6B, p. 5057–5061, dez. 1999.

YU,tingxi et al.The role of viral integration in the develoment of cervical cancer. **Cancer genetics and cytogenetics**, vz.158,n.1,p.27-34,2005

XU,Bo et al. Multiplex identification of human papillomavirus 16 DNA integration sites in cervical carcinomas. **PloS one**, v. 8,n.6,p.e66693,2013

ZANDBERG, D. P. et al. The role of human papillomavirus in nongenital cancers. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 57–81, jan. 2013.

ZHANG, Y. et al. BRCA1 interaction with human papillomavirus oncoproteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33165–33177, 30 set. 2005.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 690–698, 3 maio 2000.

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

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–265, 20 fev. 2009.

ZHANG, R.; HE, Y.; CHEN, M.; et al. Diagnosis of 25 genotypes of human papillomaviruses for their physical statuses in cervical precancerous /cancerous lesions : a comparison of E2 / E6E7 ratio-based vs . multiple E1-L1 /E6E7 ratio-based detection techniques. , p. 1–16, 2014