

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

Elyda Gonçalves de Lima

**Detecção e análise do *Papilomavírus humano* (HPV) em
carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil**

**Recife
2016**

Elyda Gonçalves de Lima

**Detecção e análise do *Papilomavírus humano* (HPV) em
carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil**

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

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Jacinto da Costa Silva Neto

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Elyda Gonçalves de

**Detecção e análise do Papilomavírus humano (HPV) em carcinomas
mamários de mulheres do Nordeste do Brasil / Elyda Gonçalves de Lima–
Recife: O Autor, 2016.**

107 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Jacinto Costa da Silva Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências e anexos

- 1. Mamas- câncer 2. Papilomavírus humano 3. Brasil,
Nordeste I. Freitas, Antonio Carlos de (orientador) II. Silva Neto,
Jacinto Costa da (coorientador) III. Título**

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-290

Elyda Gonçalves de Lima

**Detecção e análise do *Papilomavírus humano* (HPV) em
carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil**

Aprovado em 11/03/2016

Banca Examinadora:

**Dr. | Antonio Carlos de Freitas |
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. | Neide Santos |
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. | Maria Tereza Cartaxo Muniz |
Universidade de Pernambuco**

**Dra. | Nara Diniz Soares Pessoa |
Universidade de Pernambuco**

**Dra. | Adriana Vieira Gomes |
Universidade de Pernambuco**

Recife

2016

Dedico este trabalho aos meus pais com muito amor e carinho.

Agradecimentos

À Deus, pela permissão divina de alcançar esse objetivo.

Aos meus pais, Ednaldo e Eliane, pelo amor incondicional e por sempre me apoiarem dando forças para concluir essa jornada. Aos meus irmãos, Euler e Elton, pelo carinho e alegria principalmente em grandes momentos de descontração.

Ao meu noivo, Adriano Cavalcante, pelo amor, compreensão e por acreditar no meu potencial.

Agradeço a toda minha família, cunhados e amigos, pelo apoio, torcida fiel e perseverante.

A meu orientador e co-orientador, Antonio Carlos e Jacinto Costa pelo apoio e conhecimento compartilhado. Vocês foram importantes no desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À UFPE por poder desenvolver o projeto, e aos órgãos de fomento Capes e CNPq pelo apoio financeiro.

À minha amiga de jornada do doutorado Carolina Medeiros, que me ajudou a superar a rotina árdua de um laboratório e por todo conhecimento profissional e pessoal compartilhado.

Aos amigos LEMTE pelo companheirismo e apoio, em especial André, Bianca e Ana Pavla que compartilharam comigo angústias e alegrias dessa fase tão conflitante, sempre estiveram ali quando precisei, à Anna Jéssica e Ana Paula por todo estímulo, conhecimento e palavras de carinho.

As grandes parceiras de trabalho que contribuíram indispensavelmente para o andamento desse trabalho Kamylla Conceição e Dafne Quixabeira, participando ativamente de muitas etapas desse trabalho. Bem como a grande colaboração da minha primeira orientanda Marylia Seabra, e aos participantes do projeto Michelle Cardinalli e Filipe Peixe, contribuíram principalmente nas coletas do material analisado.

Aos demais colegas do LEMTE, Marcelo, Rita, Talita, Marconi, Bárbara, Humberto, Morse, Nayara e aos demais que compõe o grupo que compartilharam com suas experiências no cotidiano do trabalho, amizade, ajuda e confiança.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento da Genética que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos médicos Ana Karina, Eleonora do Hospital da Clínica- UFPE, ao Darley de Lima, bem como aos demais cirurgiões do Setor de Mastologia do Hospital Barão de Lucena, a responsável pelo laboratório de Anatomia-patológica, Ana Lima, pela colaboração e atenção.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas (UFPE) e do Hospital Barão de Lucena que me receberam e colaboraram com o projeto.

À todas as mulheres que voluntariamente participaram desse trabalho.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar
pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

Resumo

O câncer da mama é o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo. Diversos fatores estão associados ao desenvolvimento desta neoplasia, dentre elas as infecções virais. Entre os três vírus mais estudados como causa de carcinogênese mamária está o Papillomavirus humano (HPV). Assim, o objetivo foi detectar e analisar o HPV em carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil. A detecção do DNA viral foi realizada por PCR, as amostras positivas foram tipificadas por sequenciamento. A quantificação da carga viral e a determinação do *status* físico por qPCR, e a detecção das oncoproteínas de E6 e E7 de HPV por imunohistoquímica. O DNA de HPV foi detectado em 46,7% dos carcinomas de mama HPV-positivos. O HPV16 foi o mais prevalente, 92% dos casos. A carga viral do HPV apresentou uma média de 14,2 cópias em 10^4 células, nos carcinomas de mama. Além disso, em 57,2% dos carcinomas mamários HPV-positivos apresentaram o DNA viral integrado ao genoma do hospedeiro. Altas taxas de detecção das oncoproteínas E6 (89,5%) e E7 (90%) foram identificadas nos carcinomas de mama HPV-positivos. Já as proteínas supressoras de tumor, p53 e p16^{INK4A}, apresentaram taxas menores 95,7% e 92,3% respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que o vírus esteja em atividade nas células tumorais e provavelmente desempenhem papel na carcinogênese mamária.

Palavras-chave: Câncer de mama; Papilomavírus humano (HPV); Carga viral; *Status* físico do vírus; E6 e E7 oncoproteínas virais.

Abstract

Breast cancer is the type of cancer that affects more women around the world. Several factors are associated with the development of cancer, among which viral infections. Of the three most-studied virus as a cause of mammary carcinogenesis is the Human papillomavirus (HPV). The objective was to detect and analyze HPV in breast carcinomas of women in northeastern Brazil. The detection of viral DNA was performed PCR positive samples were typed by sequencing. The quantification of viral load and to determine the physical status by qPCR, and detection of the oncoproteins E6 and HPV E7 by immunohistochemistry. HPV DNA was detected in 46.7% of HPV-positive breast carcinomas. HPV16 was the most prevalent, 92% of cases. The HPV viral load averaged 14.2 copies in 10^4 cells in breast carcinomas. Furthermore, 57.2% of HPV-positive breast carcinomas showed the integrated viral DNA into the host genome. High rates of detection of E6 (89.5%) and E7 (90%) were identified in HPV-positive breast tumors. Already the tumor suppressor protein p53 and p16^{INK4a}, had lower rates 95.7% and 92.3% respectively. The results of this study suggests that the virus is active in tumor cells and probably play role in breast carcinogenesis.

Key words: Breast cancer; Human papillomavirus (HPV); Etiological factor; E6 and E7 oncoprotein.

Lista de Ilustrações

		Página
Figura 1	Células normais do ducto mamário progredindo para carcinoma ductal invasivo	21
Figura 2	Resumo esquemático com as principais características para classificação do câncer de mama.	24
Figura 3	Genoma do Papilomavírus humano	28
Figura 4	Mecanismo potencial para a propagação do HPV para a mama	38
Figura 5	Diagrama esquemático mostrando o possível envolvimento das oncoproteínas virais E6/E7 associadas a BRCA1 elevando os níveis dos receptores de estrógeno (ER- α)	47
Figura 6	Diagrama esquemático mostrando a interação entre oncoproteínas virais E6/E7e HER-2 levando ao aumento da proliferação celular	50
Figura 7	Desenho esquemático sintetizando as etapas cruciais do estudo	54
Figura 8	Representação da imunomarcagem de E6, E7, p53 e p16 ^{INK4A} em carcinoma ductal invasivo	72
Gráfico 1	Frequência do HPV nas amostras de câncer de mama e no grupo controle (não câncer)	62
Gráfico 2	Frequência do DNA de HPV nos tipos histopatológicos de câncer de mama	63
Gráfico 3	Frequência dos genótipos de HPV nos carcinomas mamário	65
Gráfico 4	Frequência do HPV em carcinomas positivos para ER, PR e HER-2	66
Gráfico 5	Frequência dos genótipos de HPV nos receptores hormonais e HER-2	67
Gráfico 6	Frequência dos genótipos de HPV em carcinomas mamários de acordo com a classificação molecular	68

Gráfico 7 Gráfico 7. Frequência dos genótipos de HPV nos carcinomas que expressaram os supressores de tumor p53 e p16^{INK4A} e as oncoproteínas virais E6 e E7

73

Lista de Tabelas

		Página
Tabela 1	Principais funções das proteínas do <i>Papilomavírus humano</i>	30
Tabela 2	Deteção do DNA de HPV em neoplasia mamária	34
Tabela 3	Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos	55
Tabela 4	Descrição dos anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica	57
Tabela 5	Frequência do HPV comparada a fatores clínico-patológicos em carcinomas mamários	63
Tabela 6	Frequência de casos HPV-positivos comparada a fatores clínico-patológicos em carcinomas mamários	64
Tabela 7	Frequência do HPV comparada a fatores clínico-patológicos em carcinomas mamários	66
Tabela 8	Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do <i>status</i> físico em carcinoma mamário HPV-positivo	69
Tabela 9	Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do <i>status</i> físico em tecido mamário benigno (não-câncer) HPV-positivo	70
Tabela 10	Frequência da expressão das oncoproteínas virais (E6/E7) e supressores tumorais (p53/p16 ^{INK4a}), em amostras HPV-positivas	71

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
DBH	Do inglês, hibridization dot blot
CDK	Quinase dependente de ciclina
CIP1	Proteinase cisteína 1 (Cysteine proteinase-1)
CIS	Carcinoma <i>in situ</i>
CK5	Citoqueratina tipo 5
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DCIS	Carcinoma ductal <i>insitu</i>
E6AP	Complexo E6 ligase ubiquitina celular
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (Epidermal growth factor receptor)
ER	Receptor de estrógeno (estrogen receptor)
EBV	Epstein Barr Vírus
HE	Hematoxilina e Eosina
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidermal 2 (Epidermal growth factor receptor 2)
HPV	Papilomavírus humano
HR	Papilomavírus de alto risco
HC	Hospital das Clínicas – UFPE
IC	Carcinoma infiltrante
IHQ	Imunohistoquímica
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
KDa	Quilodaltons

LCIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
LR	Papilomavírus de baixo risco
MMTV	Vírus do Tumor Mamário Murino
NCR	Região não codificante
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds Ratio
ORF	Quadro aberto de leitura
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PR	Receptor de progesterona (progesterone receptor)
PV	Papilomavírus
SB	Southern blot
RFLP	Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (Restriction fragment length polymorphism)
SBH	Do inglês, Hybridization Southern blot
Seq	Sequenciamento
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TNBC	Câncer de mama triplo negativo

Sumário

1. Introdução	17
2. Revisão da Literatura	19
2.1 Câncer de mama	19
2.2 Papilomavírus humano	26
2.2.1 Replicação viral	31
2.3 Papilomavírus humano e câncer de mama	33
2.3.1 Possíveis mecanismos de transmissão do HPV para a mama	38
2.3.2 Possíveis mecanismos de associação entre E6/E7 e a carcinogênese mamária	40
2.3.3 Mecanismo de associação entre E6/E7 e BRCA	34
2.3.4 Mecanismo de associação entre E6/E7 e HER-2	38
3. Objetivos	51
3.1 Objetivo geral	51
3.2 Objetivos específicos	51
4. Material e Métodos	52
4.1 Casuística	52
4.2 Aspectos éticos	53
4.3 Material biológico analisado	53
4.4 Extração do DNA	54
4.5 Detecção do DNA viral	55
4.6 Genotipagem	56
4.7 Imunohistoquímica	56
4.8 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	58
4.9 Análise estatística	60
5. Resultados	61
5.1 Caracterização das amostras	61
5.2 Análise de detecção do DNA do HPV em tecido mamário	61
5.3 Carga viral e Determinação do <i>status</i> físico do HPV	68
5.4 Detecção das oncoproteínas virais em tecido mamário	70
6. Discussão	74
7. Conclusões	83
8. Referências Bibliográficas	84
9. Anexos	94

10. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	105
---	------------

1. Introdução

O câncer de mama é um sério problema de saúde pública, devido a alta incidência, mortalidade e tratamento de alto custo. É o tipo de câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Além disso, é a neoplasia com maior número de mortes em mulheres, e o número de casos continua a crescer.

Embora a susceptibilidade genética represente um fator de risco para o câncer de mama, os fatores etiológicos que contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama não foram completamente definidos. Dentre estes fatores ambientais, as infecções virais por Tumor Mamário Murino (MMTV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o Papilomavírus humano (HPV) são os mais estudados como possíveis causas de câncer de mama em humanos. Destes, o HPV e o EBV estão associados a cerca de 38% de todas neoplasias virais associadas.

Embora o papel do HPV como fator promotor da neoplasia cervical esteja bem estabelecido, a presença do HPV como agente etiológico do câncer de mama é controversa. Além disso, os mecanismos de interações entre o agente infeccioso e células hospedeiras que ainda necessitam ser totalmente elucidados.

Muitos estudos têm mostrado que a presença do DNA do HPV em amostras de câncer de mama vem aumentando em diversas populações no mundo. Uma das hipóteses para a presença do DNA do vírus em carcinomas de mama pode ser explicada pelo transporte do DNA viral do local original da infecção para o tecido mamário, tanto pelo sangue periférico quanto pelo contato direto da região genital com a mama durante o ato sexual.

Apesar da importância, não existem estudos de detecção do DNA do HPV em tumores mamários da população do Nordeste do Brasil, sobretudo na população Pernambucana. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a associação do HPV com as neoplasias mamárias de mulheres oriundas do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Dessa forma, estudos que possibilitem uma melhor compreensão do papel do HPV no desenvolvimento dessa neoplasia levará a estratificação dos casos, implantação de medidas que minimizem o impacto da doença e possibilitem o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e ou prevenção do câncer de mama.

2. Revisão da Literatura

2.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres e uma das principais causas de morte por câncer em mulheres no mundo (Balko *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2010). Cerca de 1,67 milhões de novos casos dessa neoplasia foram estimados para o ano de 2012, em todo o mundo, o que representa 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nas mulheres. No Brasil, em 2016 são esperados cerca de 57.960 novos casos de câncer de mama (INCA, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) mais de 521.000 pessoas morreram desta doença (GLOBOCAN, 2012).

O câncer da mama é uma doença heterogênea que consiste de um número crescente de subtipos biológicos tumorais. Os tipos histológicos dessa neoplasia podem ser divididos em carcinomas não infiltrantes (*in situ*) e carcinomas infiltrantes (invasivo). Os carcinomas *in situ* (CIS) são caracterizados por células tumorais localizadas nos ductos ou lóbulos sem degradação da membrana basal ou invasão estromal. Os CIS podem ser subdivididos genericamente em carcinoma lobular *in situ* (do inglês, *lobular carcinoma in situ*, LCIS) e carcinoma ductal *in situ* (do inglês, *lobular carcinoma in situ*, DCIS) (Hondermarck *et al.*, 2008). O LCIS é geralmente caracterizado pela proliferação de células pequenas de pouca aderência em um ou mais ductos ou alvéolos terminais. Além disso, LCIS são raramente diagnosticados por exames de imagem e, por esta razão, a perda de E-caderina é avaliada como um meio de diferenciação entre o carcinoma ductal e lobular. Pacientes com alterações na região lobular têm um risco maior de 8 a 10 vezes de desenvolver câncer de mama, em comparação com as mulheres sem esse diagnóstico (Logan *et al.*, 2015). Com relação aos

DCIS, este é o tipo mais comum de câncer de mama não-invasivo (Campa *et al.*, 2015). São carcinomas mamário compostos por um conjunto de células atípicas, que se espalham para além do sistema ductal e tem uma tendência para progredir para carcinoma invasivo (Polyak, 2007).

Os CIS podem ser precursores do câncer da mama invasivo dentro de um período de tempo que pode variar entre poucos anos a décadas (Tikk *et al.*, 2015; Campa *et al.*, 2015). Morfologicamente, a progressão da doença acontece com uma evolução tecidual, partindo do epitélio normal que, sob estímulo, inicia-se o processo hiperplásico preservando as características tissulares (estado pré-maligno ou displásico), caracterizado por células epiteliais menos diferenciadas, aumento da quantidade de fibroblastos ativados e leucócitos, e pela formação de novos capilares sanguíneos no estroma. A progressão para hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e finalmente carcinoma invasivo (Figura 1) está associada à proliferação desordenada de células invadindo o estroma através da degradação da membrana basal (Polyak, 2007).

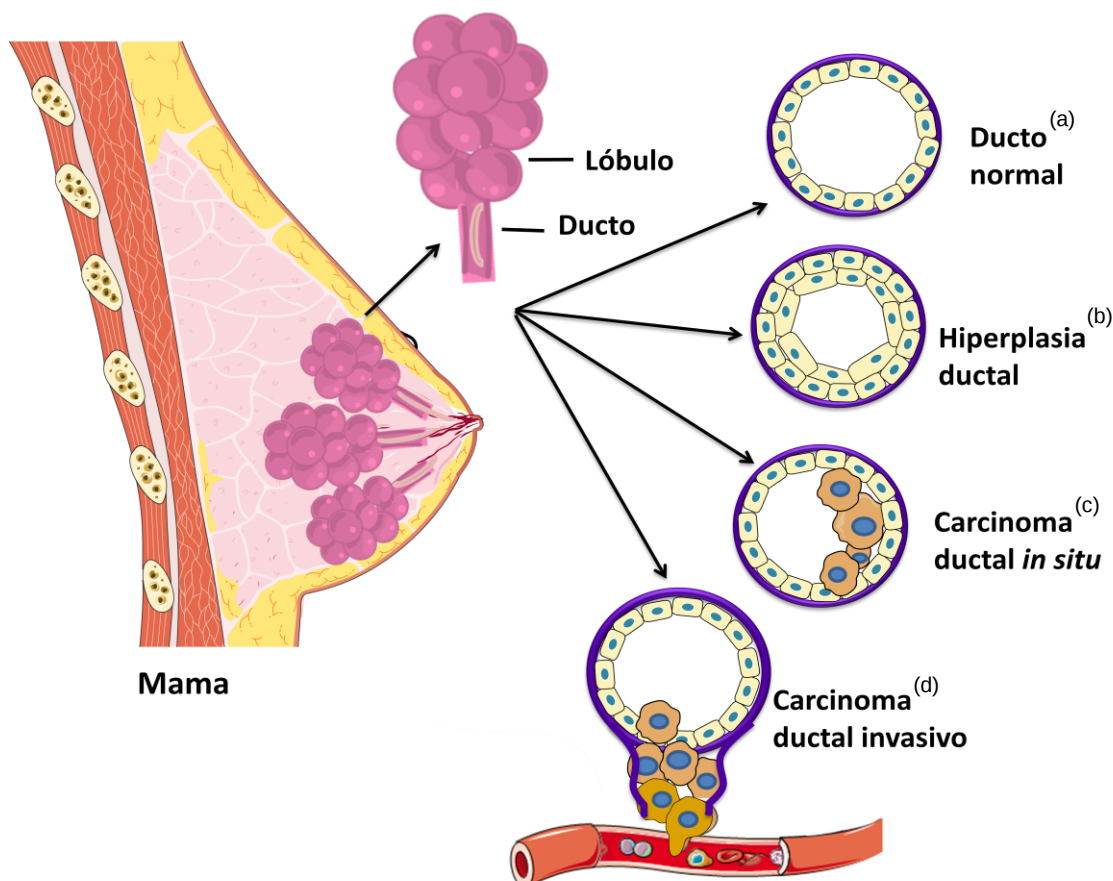


Figura 1. Células normais do ducto mamário progredindo para carcinoma ductal invasivo. O epitélio normal (a) sob estímulo pode evoluir para a hiperplasia (b), carcinoma *in situ* (c) e finalmente carcinoma invasivo (d). A célula cancerosa é deslocada a partir do tumor primário e extravaza o capilar que conduz à metástase, para locais distantes do tumor inicial (Autoria própria).

O carcinoma invasivo (IC) é um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados pela invasão de tecidos adjacentes que têm uma forte tendência para gerar metástases (Cancer, 2003). A metástase é um processo complexo, onde a colonização secundária das células cancerosas passa por uma série de eventos consecutivos antes que se torne uma lesão clinicamente detectável. Estas etapas incluem: separação do tumor primário, invasão através dos tecidos circundantes e membranas basais, entrada e sobrevivência na circulação sanguínea, vasos linfáticos ou espaço peritoneal até encontrar um órgão alvo distante. Estas podem ser seguidas por extravasamento para o tecido

circundante, sobrevivência no microambiente externo, proliferação e indução da angiogênese, escape da morte apoptótica ou resposta imunológica (Hunter *et al.*, 2008).

O IC pode ser subdividido em: carcinoma adenóide cístico, carcinoma adenoescamoso de baixo grau, carcinoma medular, carcinoma mucinoso (ou colóide), carcinoma papilar e tubular, entre outros. Estes subtipos têm características histomorfológicas que variam consideravelmente entre os casos, e levam a irregularidades nos padrões de tipos específicos de tumores (Cancer, 2003).

IC é habitualmente classificado com base em um conjunto de requisitos, tais como: formação de túbulos / glândula, pleomorfismo nuclear e número de mitoses (Cancer, 2003). 80% dos carcinomas infiltrantes mais comuns são do tipo ductal e 20% são lobulares. Carcinoma lobular invasivo está associado com idade avançada, tamanho tumoral maior e positividade para receptores hormonais (Vargo-Gogola *et al.*, 2007; Arpino *et al.*, 2004). Além desses tipos, outro tipo de neoplasia mamária é a doença de Paget, um tipo menos frequente de câncer de mama que começa nos ductos mamários e se espalha para a pele do mamilo e para a aréola (Cancer, 2003).

O câncer da mama também pode ser classificado de acordo com suas características moleculares em receptores de estrógeno e progesterona (ER e PR), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), Ki-67 (também conhecida como MKI67), citoqueratina 5 (CK5) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Figura 2). Estes ensaios são realizados através de imunohistoquímica e, mais recentemente, introduziram-se ensaios multigênicos para estimar prognóstico e tratamento mais eficaz. Alguns estudos

sugerem a realização de uma estratificação do tumor por perfis de expressão gênica somada as informações dos receptores (ER, PR e HER2) as características das células epiteliais. Essa estratificação resultou nos seguintes subtipos moleculares: Luminal A, tende a crescer de forma relativamente lenta, e têm um melhor prognóstico; Luminal B, cresce um pouco mais rápido e possui prognóstico menos promissor quando comparado a Luminal A; superexpressão de HER-2, tende a crescer mais rapidamente e possui pior prognóstico; e triplo-negativo, são os cânceres de alto grau que tendem a crescer rapidamente com pior prognóstico. No câncer de mama triplo negativo (TNBC) não há nenhuma expressão de estrógeno e progesterona, há apenas uma amplificação normal de HER2. Os TNBCs representam aproximadamente 15% de todos os cânceres de mama. Com base nesta classificação, é possível definir fatores como resposta à quimioterapia, taxa de proliferação celular, quimioterapia sistêmica adjuvante, sobrevida livre de doença, taxa de recorrência, e terapias dirigidas a públicos específicos (Cheang *et al.*, 2006; Wolff *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2007; Rakha *et al.*, 2007; Cheang *et al.*, 2009; Bhargava *et al.*, 2010; Hammond *et al.*, 2010; Yamashita, 2015; Lehmann, 2015).

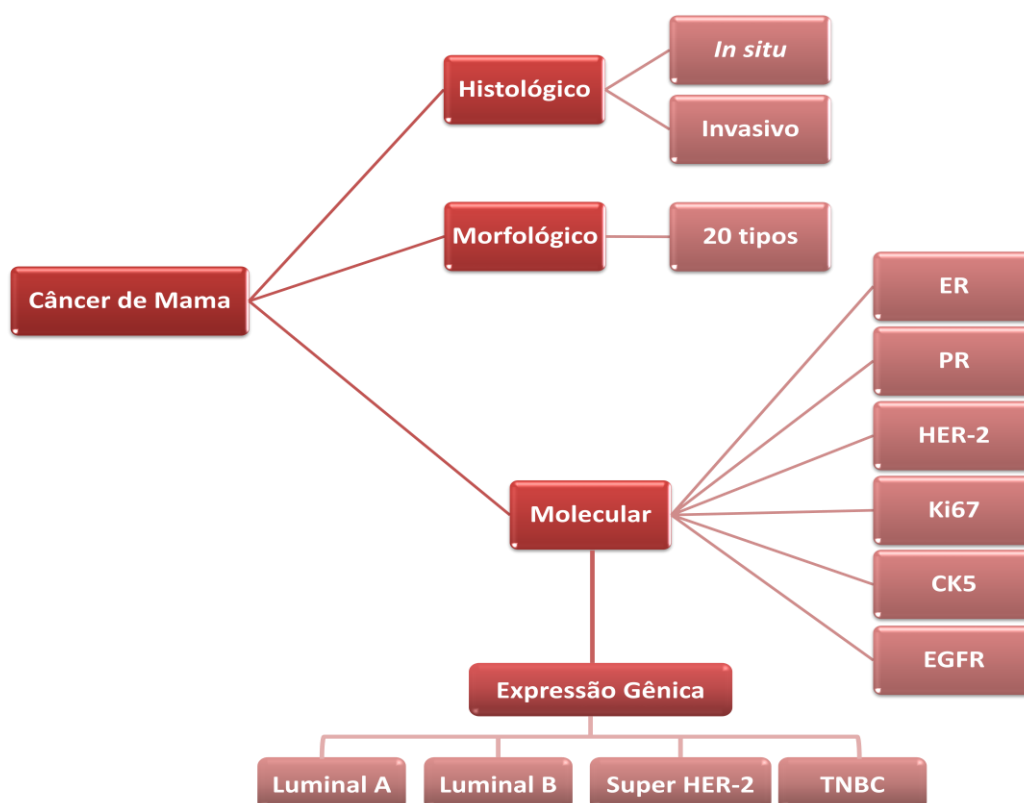


Figura 2. Resumo esquemático com as principais características para classificação do câncer de mama. O esquema pontua três grandes divisões para classificação do câncer de mama, cujas principais características abordadas para a separação dos grupos foram os padrões histológicos, morfológicos e moleculares.

ER - Receptor de Estrógeno, *PR*- Receptor de Progesterona, *CK5* - citoqueratina 5, *EGFR* - Receptor do fator de crescimento epidermal, *TNBC* - Câncer de mama triplo negativo.

A carcinogênese mamária é um processo multifatorial altamente complexo, ligado a alterações genéticas que afetam características específicas das células malignas. Alterações genéticas e modificações em vias celulares podem levar a um crescimento descontrolado, invasão e metástase (Bertram, 2000; Shachafet *et al.*, 2005). No processo carcinogênico mamário, a fase de iniciação depende de agentes responsáveis por erros na duplicação gênica, agentes químicos, vírus, radiação, ou seja, agentes endógenos e exógenos (Wood *et al.*, 2007). Além disso, fatores genéticos, alterações em proto-oncogenes, genes supressores tumorais e genes que controlam a morte celular programada ou apoptose, estão todos envolvidos na carcinogênese mamária (Bell, 2010). Conforme a atuação dos oncogenes, desencadeia-se a proliferação celular descontrolada, inibição da

diferenciação celular e perda de apoptose. O acúmulo das mutações no DNA obtidas no período de multiplicação devido às falhas nos processos de checagem do ciclo resulta na geração de células neoplásicas (Wood *et al.*, 2007; Bell, 2010; Lisanti *et al.*, 2013). Após o “disparo” neoplásico, a célula geneticamente alterada precisa se reproduzir havendo necessidade de fatores promotores ou inibidores. Essa fase é lenta e pode durar em média 6 a 10 anos (Pare *et al.*, 2013).

Há vários genes supressores de tumor, cuja alteração determinam o desenvolvimento da carcinogênese mamária, entre eles destaca-se o gene *BRCA1* (localizado no cromossomo 17q21.31). O gene *BRCA1*, está associado com aproximadamente 90% dos casos de câncer familiar, enquanto o *BRCA2* (localizado no cromossomo 13q13.1) está mais associado com o câncer da mama masculino (Contractor *et al.*, 2008; Yiannakopoulou, 2014). Esses genes podem sofrer mutações e inativação prejudicando seu funcionamento pleno. Os tipos mais comuns de mutações são pequenas deleções ou inserções ou mutações que resultam na expressão de uma proteína estruturalmente alterada que conduz à proteína não funcional. Mutações que afetam sítios de *splicing*, bem como grandes rearranjos genômicos também são observados em ambos os genes (Larsen *et al.*, 2014).

Outro gene relacionado no desenvolvimento dessa neoplasia é o oncogene *HER2*, localizado na região de 17q12. Mutações nesse gene levam ao desenvolvimento de um tumor mais agressivo. No entanto, terapia utilizando anticorpos demonstrou o sucesso do uso de trastuzumab (Herceptin), que reduz a proliferação de células e aumenta a apoptose (Kao *et al.*, 2006; Bianchini *et al.*, 2014). Superexpressão do gene *HER2* em células epiteliais mamárias humanas induz uma vantagem proliferativa, características transformantes, crescimento

tumorigênico, e em modelos 3D ocasionam alterações proliferativas e anti-apoptóticas que mimetizam estágios iniciais da transformação de células epiteliais (Moasser, 2007).

Outro gene bem estabelecido no desenvolvimento de várias neoplasias é o *TP53* (localizado no braço curto do cromossomo 17), que atua como um modulador do ciclo celular por bloqueio da divisão celular entre as fases G1 e S. No câncer de mama, mutações em *TP53* estão associadas com a doença mais agressiva e pior sobrevida global (Gasco *et al.*, 2002). Embora a p53 não seja altamente expressa no câncer da mama, foi observado alta expressão em TNBC (Wang *et al.*, 2015).

Além das mutações somáticas e na linhagem germinativa, outros fatores de risco estão associados ao câncer da mama. Por exemplo, alguns estudos sugerem a oncogênese viral como fator etiológico no desenvolvimento dessa neoplasia (Amarante *et al.*, 2009). Desde meados do século 20, quando o vírus do tumor mamário murino (MMTV) foi descoberto por causar câncer mamário em ratos, alguns vírus, especialmente o HPV, tem sido suspeito de desempenhar um papel etiológico no câncer de mama (Ohba *et al.*, 2014). Por esta razão, vários estudos têm mostrado a presença de DNA de HPV em amostras de câncer de mama, bem como uma possível correlação entre oncoproteínas virais e a doença (Lindel *et al.*, 2007; Antonsson *et al.*, 2011; Kwong *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

2.2 Papilomavírus humano (HPV)

Os HPVs são pequenos vírus de DNA de cadeia dupla com capsídeo icosaédrico. Pertencem à família *Papillomaviridae* e infectam preferencialmente epitélio escamoso (ou células com potencial para maturação escamosa) (Zur

Hausen, 1996; Stanley *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2010). Atualmente, mais de 200 tipos de HPV foram completamente caracterizados, cerca de 40 destes infectam o trato genital humano onde podem induzir uma grande variedade de manifestações clínicas, e cerca de 60 estão envolvidos no crescimento de tumores (Paavonen, 2007; Burk *et al.*, 2013).

Os HPVs são classificados em alto risco oncogênico (HR-HPV) ou baixo risco oncogênico (LR-HPV) em função da sua propensão para a progressão maligna das lesões cervicais (Zur Hausen, 1996; Zur Hausen, 1999; Zur Hausen, 2000; Zur Hausen, 2002). LR-HPV causam tipicamente infecções inaparentes/discretos, ou papilomas benignos cervicais, que podem persistir por meses ou anos, mas que são, eventualmente, deletados pelo sistema imunológico do hospedeiro. Diferentemente, os tipos HR-HPV estão relacionados com o desenvolvimento de vários tipos importantes de cânceres humano, incluindo quase todos os casos de câncer cervical, uma grande proporção dos cânceres anogenitais, tumores de cabeça e pescoço, mama e pulmão (Syrjanen, 2002; de Villiers *et al.*, 2005; Doorbar *et al.*, 2012).

O genoma do HPV contém aproximadamente 8kb dentro de um capsídeo que contém 360 cópias da proteína L1, e provavelmente 12 cópias da proteína L2. Compreende uma média de oito quadros de leitura aberta (do inglês, *Open Read Frame*, ORF), dividido em três regiões: uma região longa de controle (LCR), uma região precoce (E) e outra tardia (L) (Figura 3) (Zur Hausen, 1996; Doorbar, 2005; Bernard *et al.*, 2010). A LCR (~1 kb) corresponde cerca de 10% do genoma e regula a transcrição dos oncogenes virais E6 e E7; a região precoce (E, ~4 kb) consiste de seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) que codificam as proteínas não estruturais envolvidas na replicação; e a região tardia (L, ~3 kb), codifica as

proteínas estruturais (L1 e L2), responsáveis pela maturação e encapsidação do genoma viral (Zur Hausen, 1996; Münger *et al.*, 2004; Ganguly and Parihar, 2009).

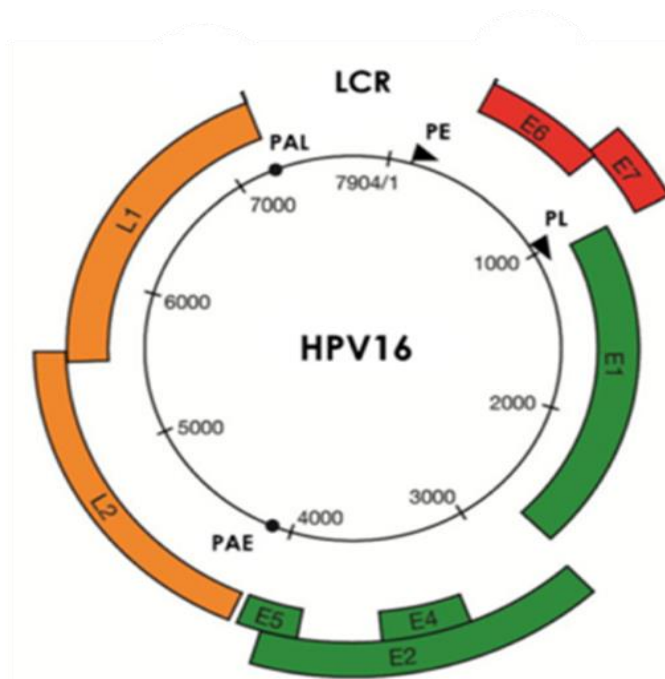


Figura 3. Genoma do Papilomavírus humano. Organização do genoma de HPV16, mostrando longa região de controle (LCR) e os oito genes que são necessários nas diferentes fases do ciclo de vida do vírus. (Adaptado de Doorbar *et al.*, 2012).

A proteína L1 é a principal proteína do capsídeo viral. L1 possui 55 kDa e capacidade de se automontar espontaneamente em partículas semelhantes ao vírus (VLPs), utilizados atualmente nas vacinas contra o HPV (Bernard *et al.*, 2010; Buck *et al.*, 2013). Além disso, L1 constitui toda a superfície exterior do vírion maduro e medeia a ligação viral na superfície celular. Após a ligação às células, L1 torna-se flexível para finalmente liberar o genoma viral para uma nova célula alvo (Buck *et al.*, 2013). Ao contrário da proteína L1, L2 é a menor proteína do capsídeo viral. Possui cerca de 75kDa e é responsável pelo encapsidamento do genoma viral, induzindo a formação do vírion pela sua ligação ao DNA viral (Fernandes *et al.*, 2013a).

A região precoce codifica para proteínas E (E1-E7) responsáveis pela patogenicidade do vírus (Venuti *et al.*, 2011). E1 desempenha vários papéis na iniciação e na catálise da síntese do DNA viral (Bergvall *et al.*, 2013). E2 é uma proteína reguladora essencial, codificada por todos os Papilomavírus (McBride, 2013). As proteínas E2 são multifuncionais e estão envolvidas em vários processos virais, principalmente associados com a transcrição e a replicação do genoma viral. Elas são expressas em estágios iniciais e intermediários do ciclo de vida viral (Bellanger *et al.*, 2011; McBride, 2013).

A proteína E4, contribui para a amplificação do genoma e síntese viral. Além de controlar a maturação do vírus e facilitar a liberação de vírions, E4 pode servir como um biomarcador da infecção ativa pelo HPV (Doorbar, 2013; Fernandes *et al.*, 2013a).

As oncoproteínas virais E5, E6 e E7 são os fatores primários responsáveis pela iniciação e progressão do câncer de colo do útero (Moody e Laimins, 2010). E5 é uma proteína transmembrana e possui um papel importante na transformação celular, tumorigênese e modulação imunológica, implicando, assim, nas etapas cruciais da carcinogênese. E5 também demonstrou impedir a apoptose após danos no DNA (Zur Hausen, 2002; Venuti *et al.*, 2011).

Um papel mais importante para a transformação maligna pode ser atribuído para os genes E6 e E7 e as suas respectivas proteínas (Tabela 1), pois são consistentemente expressos no tecido cervical maligno. Eles são independentemente capazes de imortalizar vários tipos de células humanas em cultura de tecidos, mas a eficiência é aumentada quando eles são expressos em conjunto (Zur Hausen, 2002). E7 é uma proteína acessória que não é codificada por todos os papilomavírus (Roman e Munger, 2013). E7 também altera o

controle do ciclo celular através de interações com histona desacetilases, ciclinas e inibidores de quinases dependente da ciclina (CDK). Além disso, E7 inativa a proteína do retinoblastoma (Rb) contribuindo para progressão tumoral. A inativação de pRb aumenta os níveis de p53 que, conseqüentemente, é degradada por E6. E6 também ativa a expressão da telomerase e modula a atividade de proteínas contendo o domínio PDZ (Zur Hausen, 2002; Stanley *et al.*, 2007; Moody e Laimins, 2010).

Tabela 1: Principais funções das proteínas do *Papilomavírus humano* (adaptado de Stanley *et al.*, 2007 e Fernandes *et al.*, 2013a).

Proteínas	Principais funções
E1	Atua como helicase ATP-dependente essencial para a replicação do DNA viral;
E2	Controla a transcrição viral; Liga-se a E1 para facilitar a replicação do DNA viral;
E4	Favorece a amplificação do genoma de HPV; Controla a maturação do vírus, facilitando a liberação de vírions;
E5	Aumenta a atividade transformadora da E6 e E7; Promove a fusão entre as células; Contribui para a evasão da resposta imune;
E6	Liga-se e degrada a proteína p53; Inibe a apoptose; Interage com proteínas da resposta imune inata; Ativa a expressão da telomerase;
E7	Interage com pRb; Aumenta a atividade de CDK; Afeta a expressão de genes em fase S através da interação direta com o fator de E2F; Contribui para a evasão resposta imune;
L1	Principal proteína do capsídeo viral; Medeia a ligação viral aos receptores da superfície celular; É uma proteína altamente imunogênica e possui epítomos conformacionais que induzem a produção de anticorpos específicos do tipo neutralizantes contra o vírus;
L2	Menor proteína do capsídeo viral; Contribui para a ligação do vírion no receptor das células, favorecendo a sua absorção e transporte para o núcleo.

2.2.1 Replicação viral

Os HPVs compreendem um grupo diversificado com diferentes estratégias do ciclo de vida (Doorbar *et al.*, 2012). No entanto, o conhecimento do ciclo de replicação do HPV é obtido a partir de estudos de células epiteliais do colo do útero, (Zur Hausen, 1999; Zur Hausen, 2000; Zur Hausen, 2002; Doorbar, 2005; Lindel *et al.*, 2007) podendo se comportar de forma diferenciada no câncer de mama.

Os HPVs infectam células epiteliais, e dependem da diferenciação do epitélio para a conclusão do seu ciclo viral. A expressão dos genes virais está estreitamente relacionada com a diferenciação das células basais infectadas que migram em direção à superfície epitelial. Em decorrência disso, o ciclo de replicação leva muito tempo, pois do início da infecção até a liberação de novos vírions leva em média 3 semanas, uma vez que este é o tempo necessário para o queratinócito se submeter a completa diferenciação (Doorbar, 2005; Stanley *et al.*, 2007).

Ainda não está totalmente elucidado o mecanismo utilizado pelo HPV para entrada do vírus na célula (Doorbar, 2006). Entretanto a síntese de novos vírions ocorre após a célula infectada sofrer mitose passando para as células filhas. Acredita-se que a internalização realizada pela maioria dos HPVs ocorre por endocitose, em seguida ocorre o desnudamento do capsídeo viral e exposição do genoma. Posteriormente, L2 facilita a transferência do DNA viral para o núcleo da célula (Doorbar, 2006; Horvath *et al.*, 2010).

Após a entrada nas células, os genomas virais estão estabelecidos como plasmídeos nucleares (Hindmarsh e Laimins, 2007). Ao chegar ao núcleo celular ocorre o início da replicação viral. A proteína E1 forma heterodímeros com E2,

consequentemente, esse complexo E1-E2 reconhece a sequência palindrômica (AACCg(N4)cGGTT) e liga-se a ela. A formação desse complexo, E1-E2, na origem de replicação causa distorção no DNA viral, facilitando o recrutamento de moléculas E1 adicionais e a eventual perda de E2 (Doorbar, 2006). A perda de E2 leva ao aumento da expressão dos genes E6 e E7, que consequentemente desregula a expressão dessas proteínas. A superexpressão de E6 e E7 inativa as proteínas supressores do tumor p53 e pRb, respectivamente (Al Moustafa *et al.*, 2004; Zur Hausen, 2009; Venutti *et al.*, 2011).

A atividade de DNA helicase de E1 desenrola o DNA para que a fita sirva de molde para a síntese de novos genomas virais. A proteína E1 liga-se às proteínas de replicação celular e a replicação do DNA progride bidirecionalmente a partir da origem de replicação viral (Doorbar, 2006).

Posteriormente, o DNA é empacotado através da associação com histonas celulares. Então, E2 guia o DNA para dentro do capsídeo e o HPV é liberado da célula. A liberação eficiente da partícula viral parece ser dependente de E4, que se associa aos filamentos de queratina celular, afetando a estabilidade mecânica (Doorbar, 2006).

O início da infecção pelo HPV ocorre nas células da camada basal das células epiteliais escamosas estratificadas, formando um reservatório de infecção, mantendo o genoma viral com baixo número de cópias, aproximadamente 50 cópias, na forma episomal e limitando a transcrição dos primeiros genes (Zur Hausen, 2002; Hindmarsh e Laimins, 2007; Doorbar *et al.*, 2012). A expressão de E6 e E7 nessas camadas inferiores dirige a célula para a fase S (Doorbar, 2005). No entanto, durante divisão celular, uma das células filhas permanece na camada basal, enquanto a outra célula migra para a camadasuprabasal, onde

há expressão de elevados níveis de proteínas tardias, responsáveis pela montagem viral. Dessa forma, inicia-se a diferenciação, levando à amplificação do DNA viral (McMurray *et al.*, 2001; Doorbar, 2005; Stanley *et al.*, 2007).

A fase final do ciclo viral, durante o qual são montados novos vírions, ocorre apenas em queratinócitos em etapas de diferenciação terminal que em última análise levam à descamação do epitélio (Buck *et al.*, 2013).

2.3 Papilomavírus humano e câncer de mama

A maioria das mulheres infectadas pelo HPV elimina o vírus espontaneamente, através de mecanismos imunológicos. No entanto, uma pequena porcentagem das mulheres infectadas pelo vírus irá desenvolver uma infecção persistente, e estarão sob risco de desenvolver o câncer cervical (Zur Hausen, 2002).

Vários estudos têm sugerido que a infecção pelo HPV também pode estar envolvida na carcinogênese mamária (Tabela 2). No entanto, inúmeros questionamentos foram levantados sobre o possível papel do HPV no desenvolvimento do câncer de mama (Lindel *et al.*, 2007; De Cremoux *et al.*, 2008; Hachana *et al.*, 2010; Hedau *et al.*, 2011; Kwong *et al.*, 2013). Devido ao número crescente de estudos que relataram a presença do DNA do HPV no câncer de mama e em tecido mamário normal, vários questionamentos foram levantados, entre eles o fato da ausência da detecção do DNA viral em determinados estudos (Bratthauer *et al.*, 1992; Czerwenka *et al.*, 1996; Gopalkrishna *et al.*, 1996). Entre as possíveis explicações para isso, podemos destacar a dificuldade em detectar o vírus, causada provavelmente pela baixa carga viral e baixa frequência de HPV no câncer de mama em algumas

populações. Além disso, o tipo de metodologia empregada em alguns estudos pode ter dificultado a identificação do vírus nas amostras estudadas (Heng *et al.*, 2009). Apesar disso, algumas evidências corroboram com uma ligação entre o HPV e o câncer de mama, identificando HPVs de alto risco, por diferentes técnicas, entre 25%-100% dos casos de câncer de mama, em mais de 30 estudos realizados em grandes populações (Li *et al.*, 2011; Simões *et al.*, 2012; Ohba *et al.*, 2014).

Tabela 2. Detecção do DNA de HPV em neoplasia mamária (adaptado Joshi & Buehring, 2012; Amarante & Watanabe, 2009).

Ano	Autor	País	Tipo de HPV	Preservação do tecido	Técnica de detecção
1992	Di Lonardo <i>et al.</i>	Itália	16	Tecido parafinado	PCR/ISH
1992	Bratthauer <i>et al.</i>	EUA	6,11,16,18	Tecido parafinado	PCR/ SB
1996	Czerwenka <i>et al.</i>	Austrália	6/11,16/18, 3/33/35	Tecido parafinado	PCR/DBH
1996	Gopalkrishna <i>et al.</i>	Índia	16 e 18	Tecido parafinado	PCR/ SB
1999	Henning <i>et al.</i>	Noruega	11,16,18,33	Tecido parafinado	PCR/ ISH
1999	Yu <i>et al.</i>	China	16,18 e 33	Tecido parafinado	PCR/ SB
2000	Yu <i>et al.</i>	China	16,18 e 33	Tecido parafinado	PCR/ SB
2001	Liu <i>et al.</i>	EUA	16, 18 e 33	Tecido parafinado	PCR/DBH
2004	Damin <i>et al.</i>	Brasil	16 e 18	Tecido parafinado	PCR/seq
2004	Widschwendter <i>et al.</i>	Austria	16	Tecido parafinado	PCR/Elisa
2005	De Villiers <i>et al.</i>	EUA	8 e 16	Tecido parafinado	PCR/ seq
2005	Kan <i>et al.</i>	Austrália	16, 18 e 33	Tecido congelado	PCR/ seq
2005	Tsai <i>et al.</i>	Taiwan	16, 18 e 33	Tecido fresco	PCR
2006	Kroupis <i>et al.</i>	Grécia	6,11,16,18,3 1,33, 52, 58, 59, 72	Tecido congelado	PCR/RFLP
2006	Gumus <i>et al.</i>	Turquia	11,16,18,33	Tecido fresco	PCR
2007	Choi <i>et al.</i>	Coréia	16, 18 e 33	Tecido parafinado	PCR
2008	Akil <i>et al.</i>	Síria	16, 18, 31, 33 e 35	Tecido parafinado	PCR/Microarray
2008	Khan <i>et al.</i>	Japão	16, 18 e 33	Tecido parafinado	PCR/qRT-PCR
2009	He <i>et al.</i>	China	16	Tecido fresco	PCR

Ano	Autor	País	Tipo de HPV	Preservação do tecido	Técnica de detecção
2009	De León <i>et al.</i>	México	16 e 18	Tecido parafinado	PCR/ seq
2009	Mendizabal-Ruiz <i>et al.</i>	México	16, 18 e 33	Tecido parafinado	PCR/ seq
2009	Heng <i>et al.</i>	Austrália	16 e 18	Tecido parafinado	PCR <i>in situ</i> / seq
2009	Lawson <i>et al.</i>	Austrália	16 e 18	Tecido parafinado	PCR <i>in situ</i> / seq
2010	Aceto <i>et al.</i>	Argentina	16 e 18	Tecido parafinado	PCR <i>in situ</i> / ISH
2011	Aguayao <i>et al.</i>	Chile	16	Tecido parafinado	PCR
2011	Antonsson <i>et al.</i>	Austrália	18	Tecido fresco	PCR/ ISH
2011	Herrera-Goepfert <i>et al.</i>	México	16 e 31	Tecido parafinado	ISH
2012	Baltezell <i>et al.</i>	EUA	16	Tecido parafinado	PCR <i>in situ</i> /ISH
2012	Sigaroodi <i>et al.</i>	Irã	6, 11, 15, 16, 18, 23 e 124	Tecido parafinado	PCR/seq
2013	Francis <i>et al.</i>	Kuwait	6, 11,16,18,31 e 33	Tecido parafinado	CISH
2013	Suarez <i>et al.</i>	Argentina	6, 11, 13, 16, 18 e 87	Tecido fresco	PCR/ seq
2014	Wang <i>et al.</i>	China	16	Tecido fresco	PCR <i>in situ</i>
2014	Ohba <i>et al.</i>	Singapura	16,18, 31, 35, 56 e 59	Tecido fresco	Microarray
2014	Manzouri <i>et al.</i>	Irã	11, 16, 18, 33, 35, 45 e 55	Tecido parafinado	PCR
2015	Ali <i>et al.</i>	Iraque	16, 18, 31, 33	Tecido parafinado	ISH
2015	Fu <i>et al.</i>	China	58	Tecido parafinado	PCR
2015	Fernandes <i>et al.</i>	Venezuela	6, 11, 18, 33 e 51	Tecido fresco	Reverse hybridization
2015	Li <i>et al.</i>	China	6/18 e 16	Tecido parafinado	PCR

DBHdo inglês, hibridizaçãodot blot; ISH hibridização *in situ*; RFLP do inglês, restriction fragment length polymorphism; SB do inglês, Southern blot; seq sequenciamento.

Di Lonardo *et al.* (Di Lonardo *et al.*, 1992) investigaram a presença do DNA de HPV em carcinomas de mama embebidos em parafina, e encontrou DNA de HPV16 em 29,4% das amostras de câncer da mama. Posteriormente, outros estudos confirmaram a presença de DNA do HPV no câncer de mama infectado com HR-HPV (16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58) e LR-HPV (6, 11, 15, 23, 55, 59, 72, 87 e 124). A presença de HR-HPV variou de 4% a 86% em amostras de câncer da mama (Di Lonardo *et al.*, 1992; de León *et al.*, 2009; Amarante *et al.*, 2009;

Hsu *et al.*, 2010). O HPV16 foi encontrado principalmente em mulheres diagnosticadas com câncer cervical que posteriormente desenvolveram câncer de mama (Hennig *et al.*, 1999; Hossein *et al.*, 2013). Além disso, HPV16 foi encontrado no soro de pacientes com câncer do colo do útero e da mama (Widschwendter *et al.*, 2004). O HPV18 foi o tipo mais comum encontrado em mulheres Australianas com câncer de mama (Kan *et al.*, 2005; Antonsson *et al.*, 2011), enquanto HPV33 foi o genótipo mais frequentemente encontrado em mulheres Chinesas e Japonesas diagnosticadas com essa neoplasia (Yu *et al.*, 1999; Yu *et al.* 2000). Já os HPVs11, 16 e 18 foram identificados em tumores malignos de mama tanto nos Estados Unidos quanto no Brasil (Liu *et al.*, 2001; Damin *et al.*, 2004).

No entanto, a identificação do DNA viral não é suficiente para estabelecer uma relação direta entre causa e efeito (Heng *et al.* 2009, Hedau *et al.*, 2011), sendo controverso o papel do HPV como um fator etiológico para o desenvolvimento do câncer de mama. Contudo, alguns estudos têm avaliado o estado físico do HPV, a carga viral, a atividade das oncoproteínas de E6 / E7 e a presença de transcritos de E6 / E7 em tumores malignos da mama (Aguayo *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2008; Herrera-Goepfert *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2015) com o objetivo de esclarecer a relação do vírus com a carcinogênese mamária. Um exemplo disso foi um estudo realizado no Chile, com pacientes do sexo feminino, mostrando que em todos os carcinomas mamário HPV-positivos, os oncogenes virais estavam integrados ao genoma do hospedeiro (Aguayo *et al.*, 2011).

Recentemente, Fimereli *et al.* (Fimereli *et al.*, 2015) avaliaram o transcriptoma viral, incluindo transcritos de HPV em pacientes com câncer de mama e identificou a presença de sequências virais integradas, mesmo em um

número pequeno de amostras positivas. Dessa forma, é possível que o vírus infecte o tecido alvo, e as sequências virais ao se integrar no DNA do hospedeiro realize ações mutagênicas que transformam a célula da mama. Além disso, a razão pela qual este processo de infecção não é detectável pode ser atribuída a um mecanismo de *hit-and-run*, no qual o HPV pode agir como um iniciador na carcinogênese e então desaparecer, resultando em falhas nas técnicas de detecção (Mant *et al.*, 2004; Fimereli *et al.*, 2015).

Existem poucos estudos que correlacionam a agressividade do tumor mamário e a presença do HPV, mas dentre alguns estudos publicados, verificou-se que HPV16 foi encontrado em formas mais agressivas de câncer de mama (invasivo e metastático) e raramente em pacientes com carcinoma *insitu* (Yasmeen *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que a prevalência da infecção pelo HPV (HPV16 e HPV18) é maior nos carcinomas de mama metaplásicas do que carcinomas de mama não-metaplásicas (Herrera-Goepfert *et al.*, 2013). Além disso, pacientes HPV-positivo que desenvolveram câncer de mama apresentaram um tipo mais agressivo e um desenvolvimento precoce da doença, em média de 15 anos antes do seu estabelecimento quando comparados a pacientes com câncer de mama HPV-negativo (Kroupis *et al.*, 2006). Quando correlacionado ao tipo morfológico dessa neoplasia, pacientes HPV-positivas geralmente apresentam câncer de mama do tipo ductal em vez do tipo lobular (Antonsson *et al.*, 2011).

Com base nos dados supracitados, existe uma necessidade de compreender o papel dos HPVs em tecido mamário, ou seja, se são agentes etiológicos da carcinogênese mamária ou apenas passageiros ou parasitas no câncer de mama (Khammapirad *et al.*, 2011).

2.3.1 Possíveis mecanismos de transmissão do HPV para a mama

O mecanismo potencial de transmissão do HPV para a mama permanece desconhecido, e as opiniões se dividem entre o contato direto da região genital com a mama, e a disseminação hematológica (Figura 4).

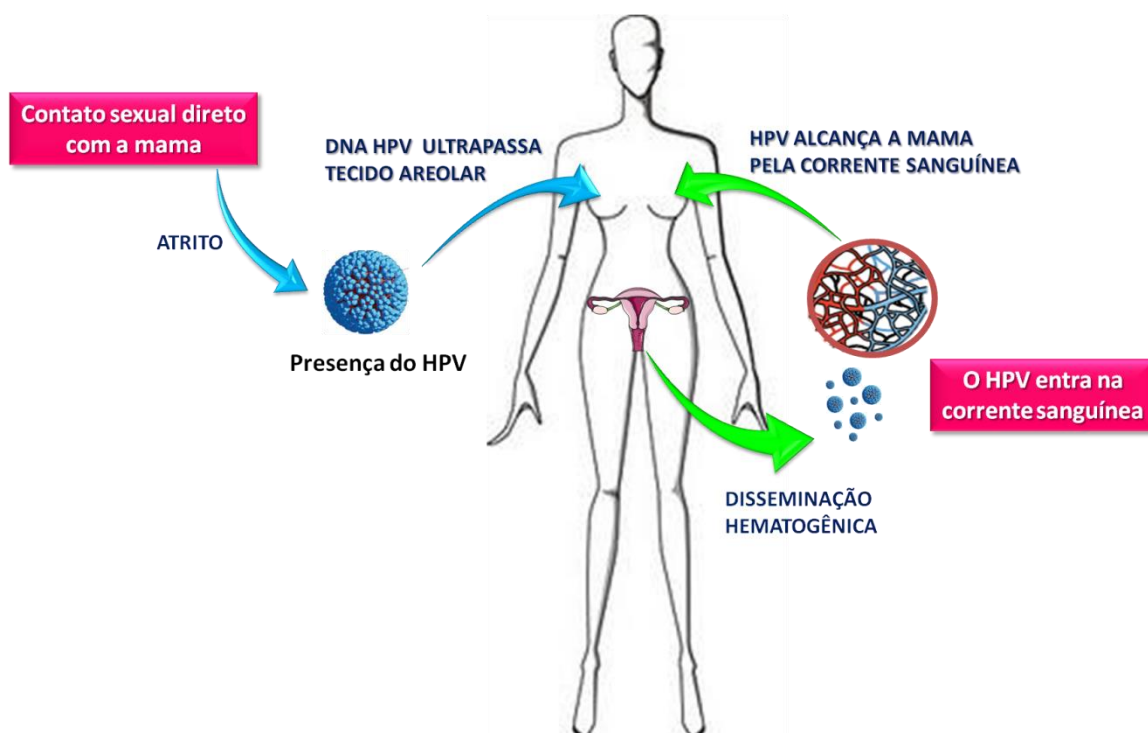


Figura 4. Mecanismo potencial para a propagação de HPV para a mama. Duas hipóteses são apresentadas para a propagação de HPV para a mama: transmissão sexual, por contato direto da região genital com o seio; e disseminação hematogênica, através da corrente sanguínea o DNA viral ultrapassa o sítio original da infecção atingindo o tecido mamário (Autoria própria).

A transmissão do HPV para a mama pode ocorrer através do contato sexual. É possível que HPV's genitais possam chegar à mama através da rota oro-genital ou diretamente por meio de contatos genitais-mama, havendo transmissão do HPV por via mecânica, onde o vírus entra em atrito com a pele (Chang *et al.*, 2013).

A superfície externa do mamilo é uma área sexualmente ativa, estreitamente envolvida durante o ato sexual, levando a uma possível

transmissão da infecção do HPV através da pele, pela fricção da região genital com os seios. Dessa forma, poderia ocorrer a propagação do vírus para um grande número de novos hospedeiros, especialmente, em indivíduos com múltiplos parceiros sexuais (Hedau *et al.*, 2011; Vinodbhai, 2013). Alguns trabalhos que corroboram com essa hipótese, mostraram que mulheres com câncer de mama e infecção cervical possuíam o mesmo tipo de HPV em ambos os tumores (Vinodbhai, 2013; Hossein *et al.*, 2013).

Além disso, alguns estudos identificaram a presença do DNA do HPV não só no câncer de mama primário (Kroupis *et al.* 2006; de León *et al.*, 2009), mas também no tecido areolar (de Villiers *et al.*, 2005; Antonsson *et al.*, 2011; Herrera-Goepfert *et al.*, 2011) e leite materno (Glenn *et al.*, 2012), sugerindo que o HPV pode introduzir na mama e infectar o epitélio da região do mamilo e aréola (Antonsson *et al.*, 2011).

Outra hipótese levantada para a presença do HPV em tecido tumoral mamário pode ser explicada pelo transporte do DNA viral a partir do sítio de origem da infecção para o tecido da mama através das vias hematológicas ou linfáticas (Hennig *et al.*, 1999; Khammapirad *et al.*, 2011). Assim, as vias hematológicas e/ou linfáticas poderiam estar relacionadas com a disseminação de células susceptíveis em órgãos-alvo distantes, através do DNA de HPV circulante derivado do tumor primário (Widschwendter *et al.*, 2004). Por outro lado, é possível também que os detritos celulares contendo HPV seja transportado através da via hematológica a partir do local da infecção por HPV para a mama (Bodaghi *et al.*, 2005).

Estudos identificaram o DNA do HPV no soro de pacientes com câncer cervical, decorrente da infecção pelo vírus, associado ao câncer de cabeça e

pescoço, o que pode sustentar a hipótese de uma possível transferência hematogênica do HPV de um órgão para outro (Capone *et al.*, 2000; Pornthanakasem *et al.*, 2001). Pao *et al.* (1991), foram os primeiros a relatar a presença de diferentes tipos de HPVs [6, 11, 16, 19] em células mononucleares de sangue periférico de pacientes, do sexo feminino, afetados por infecções por HPV do trato genito-urinário.

Outro exemplo disso foi a detecção de oncogenes do HPV em locais distantes do sítio da infecção, como a detecção de HPV em linfócitos do sangue periférico de pacientes com câncer urinogenital e câncer de cabeça e pescoço, câncer pulmonar bronco, câncer de mama e linfoma de Hodgkin (Widschwendter *et al.*, 2004; Hedau *et al.*, 2011). Estes achados podem ser explicados pela possibilidade das células infectadas com HPV acumularem gradualmente mutações não reparadas, aumentando assim a instabilidade genômica e potencialmente levando a malignidade em outros sítios (Baltzell *et al.*, 2011).

2.3.2 Possíveis mecanismos de associação entre E6/E7 e a carcinogênese mamária

Um dos eventos-chave do processo da carcinogênese induzida pelo HPV é a integração do genoma do vírus no genoma do hospedeiro (Münger *et al.*, 2004). A hipótese de que o HPV está envolvido na carcinogênese mamária pode ser suportada pela capacidade do vírus imortalizar células epiteliais normais da mama *in vitro*, levantando a possibilidade de que o HPV pode estar etiologicamente relacionado com o câncer de mama. A imortalização dessas células por HPV16 e HPV18 foi utilizada para estudar as funções das oncoproteínas virais E6 e E7 em diferentes vias celulares (Band *et al.*, 1990).

As oncoproteínas E6 e E7 do HPV são as responsáveis pela transformação maligna das células infectadas, interferindo na função das proteínas-chave da supressão tumoral através dos genes p53 e pRb, respectivamente. Dessa forma, as oncoproteínas facilitam o desenvolvimento de malignidades, devido à ativação do ciclo celular descontrolado e a inibição da apoptose, nas lesões associadas ao HPV (Hedau, 2011; Fernandes *et al.*, 2015).

No câncer cervical, a integração dos oncogenes E6 e E7 no genoma do hospedeiro resultam na superexpressão destes oncogenes virais. Como consequência disso, a oncoproteína E6 facilita a degradação de p53 através de sua associação com uma proteína acessória (E6AP). A formação do complexo E6-E6AP-p53 resulta na degradação de p53 pela via da ubiquitina proteolítica, que se torna ubiquitinada e, portanto, alvo de proteossomos (Yasmeen *et al.*, 2007). O objetivo da degradação de p53 é facilitar a replicação viral, podendo causar danos ao DNA que não será reparado; além disso, impede a regulação no ciclo celular levando à transformação maligna das células (Elbel *et al.*, 1997).

Além da sua interação com p53, a oncoproteína E6 induz a degradação da proteína pró-apoptótica BAK gerando instabilidade celular, e ativa a telomerase e as quinases da família SCR da célula hospedeira estimulando o crescimento celular (Zur Hausen, 2002). Embora seja desconhecido o papel do HPV no câncer de mama, alguns estudos mostram evidências que a função do oncogene E6 em células cervicais pode ser semelhante nas células do tumor mamário. Tentando compreender esses mecanismos, um estudo relatou níveis significativamente mais baixos de p53 e p21 (WAF1) em carcinomas da mama de pacientes HPV positivas (HPV16) quando comparadas a pacientes HPV negativo (Widschwendter *et al.*, 2004).

Da mesma forma que E6, E7 desempenha um papel fundamental nos mecanismos de transformação celular no câncer cervical oriundo da infecção pelo HPV. E7 interage com pRb pela via ubiquitina dependente. A ligação de E7 com pRb, impede sua interação com o fator de transcrição E2F, aumentando a expressão de p16, podendo levar à apoptose de células que expressam a proteína E7 (Longworth *et al.*, 2005). Além disso, E7 permite a entrada prematura da célula para a fase S e provavelmente bloqueia a função de p21 e KIP1 (também conhecida como p27), o que leva à proliferação descontrolada (Zur Hausen, 2002; McLaughlin *et al.*, 2009).

Embora, até o momento, não existam estudos publicados que forneçam informações sobre os níveis de E7 em amostras de câncer de mama HPV positivos, pesquisadores propuseram diferentes mecanismos de atuação do vírus na carcinogênese mamária. Dentre estes está uma possível interação do HPV com os hormônios esteroides femininos, tal como o estrógeno, implicado na carcinogênese cervical (Chung *et al.*, 2008).

No tecido mamário normal, o estrógeno promove o desenvolvimento do estroma, com o crescimento de um extenso sistema de ductos e a deposição de gordura. Este hormônio também dá início ao crescimento mamário e é responsável pelo aspecto externo das mamas femininas adultas (Vergote *et al.*, 2000; Clemons e Goss, 2001). Entretanto, a exposição prolongada ao estrógeno no epitélio ductal parece está relacionada à progressão e desenvolvimento do câncer de mama (Clemons e Goss, 2001; Fuqua, 2001; Sommer e Fuqua, 2001; Yoshida *et al.*, 2004). Acredita-se que a exposição cumulativa ao estrógeno medeia os efeitos de vários fatores de risco para o câncer de mama, além de

promover a proliferação de células neoplásicas, induzir aneuploidias e gerar efeitos genotóxicos (Russo e Russo, 2006).

Sabe-se que os receptores hormonais se ligam aos hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares. Cerca de 60-70% dos casos de carcinomas de mama apresentam expressão do receptor de estrógeno (Nadji *et al.*, 2005). Testes em ratos avaliaram que a associação entre estrógeno e a perda de p53 por meio da ação da proteína E6, resultam no desenvolvimento precoce de tumores, além disso, sugere um fenótipo de tumores mamários mais agressivos (Shai *et al.*, 2008).

Um estudo realizado por Ohba *et al.* (2014) demonstrou que em células tumorais da mama, o receptor de estrógeno está significativamente associado com a infecção pelo HR-HPV. Esta observação pode ser explicada por dois fatores: 1) o estrógeno pode afetar diretamente a transcrição dos oncogenes E6 / E7 do HPV no câncer de mama, ou; 2) as células ER-positivo pode ser um alvo inicial normal do HPV, porque estas células são ativadas por um aumento da sinalização de estrógeno. Assim, o HPV pode desempenhar um papel no câncer de mama precoce, uma vez que existem sinais de uma relação entre estrógenos e da HR-HPV E6 / E7 nos estágios iniciais de câncer de mama. Além disso, estudos usando ratos como modelo tem demonstrado que a sinergia entre estrogênio e insuficiência p53 pela proteína E6 é um fator importante na carcinogênese do câncer cervical e de mama (Allred *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2008).

Outro possível mecanismo avaliado para determinar se o HPV pode ser o ponto de partida na carcinogênese da mama, compreende a relação entre o este vírus e APOBEC3B (A3B). A APOBEC3 são enzimas celulares, pertencentes a

família da citidina desaminase, responsáveis por induzirem mutações no genoma viral. Esse fenômeno, conhecido como hipermutação, elimina o conteúdo informacional dos genomas virais. O estudo realizado por Ohba e colaboradores (2014), mostrou que o HPV leva a superexpressão da A3B, permitindo mutações excessivas, ciclo celular desregulado e subsequente transformação, além de estarem relacionado com um fenótipo mais agressivo do câncer (Ohba *et al.*, 2014; Cescon *et al.*, 2015).

Estudos buscaram compreender possíveis correlações entre as oncoproteínas virais, E6 e E7 de HR-HPV, com a modulação de vias celulares pré-estabelecidas no desenvolvimento de câncer de mama. Dentre estes, alguns estudos avaliaram uma possível associação entre E6/E7 na regulação dos genes BRCA (Rassi *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2005) e HER-2 (Al Moustafa *et al.*, 2004, Ignatoski *et al.*, 2005; Yasmeen *et al.*, 2007), ambos relacionados com a tumorigênese mamária. Por outro lado, um estudo observou que E6 e E7 de LR-HPV, HPV6 e HPV11, não afetam estas vias celulares na mesma proporção da infecção pelo HR-HPV (de Villiers *et al.*, 2005).

2.3.3 Mecanismo de associação entre E6/E7 e BRCA

Atualmente, estima-se que cerca de 5-10% de todos os cânceres de mama estão associados com os genes *BRCA1* e *BRCA2* (Khammapirad *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2014). *BRCA1* e *BRCA2* são genes estruturalmente complexos, importantes supressores de tumor, responsáveis pela estabilidade genômica por meio de seu papel na sinalização de danos e nos mecanismos de reparo ao DNA. Além disso, interage com RAD51 na reparação da cadeia dupla de DNA danificadas pelo processo de recombinação homóloga (Larsen *et al.*, 2014).

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* levam a uma instabilidade cromossômica podendo resultar na carcinogênese devido alguns fatores, que podem ser; 1) mutações que geram perda de função, 2) silenciamento epigenético, 3) ou uma mutação na linhagem germinativa/somática. Assim, esta instabilidade cromossômica resultaria no aumento da transcrição gênica responsáveis pela regulação negativa na expressão desses genes (Fasano *et al.*, 2009). Mutações em *BRCA1* e *BRCA2* estão relacionadas com o desenvolvimento precoce do câncer de mama em mulheres jovens e também estão ligados ao câncer de ovário, câncer de mama bilateral e câncer de mama masculino (Larsen *et al.*, 2014).

O risco de câncer de mama em mulheres com esta mutação é estimado como sendo de 80% (Hernández *et al.*, 2014). A expressão do gene *BRCA1* no tecido mamário é aumentada durante a puberdade e gravidez, quando os níveis de estrógeno são altos. O estrógeno exerce um efeito proliferativo em células da mama. A hipótese de que existe uma ligação entre esse hormônio e a expressão de *BRCA1*, é apoiada pelo fato de que alguns estudos mostraram que o estrógeno e a progesterona estimulam a expressão de *BRCA1* nessas células (Pujol *et al.*, 2004; Allred *et al.*, 2004).

A expressão de mRNA de *BRCA1* e dos receptores de estrógeno estão intimamente ligados, sugerindo uma relação funcional entre esses dois genes (Zhang *et al.*, 2005). Fan *et al.* (1999) demonstraram que a proteína BRCA1 tem habilidade de regular a resposta celular aos estrógenos. Estudos *in vitro* mostraram que a proteína BRCA1 pode inibir a transcrição de genes regulados pelo receptor alfa de estrógeno (ER- α) nas linhagens de células cancerosas de mama e próstata. Estes resultados sugerem que, além da manutenção da

estabilidade genômica durante períodos de rápida divisão e proliferação celular, BRCA1 também pode suprimir sinais iniciados pela ativação dos ER- α quando a expressão de estrógenos e BRCA1 estão elevadas (Hilakivi-Clarke, 2000). Além disso, a metilação do promotor de BRCA1 parece está fortemente correlacionada com a baixa expressão dos receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) (Rosen et al., 2005).

Estas considerações sugerem um modelo de tumorigênese por mutações no gene *BRCA1*, em que a perda da função deste gene leva à acumulação de mutações em células epiteliais mamárias. Além disso, estas células mutantes são estimuladas a se multiplicar pela perda da regulação da proliferação celular provocada pelo estrógeno. *BRCA1* também pode atuar através da promoção da diferenciação de células epiteliais mamárias, e assim reduzir o número de células estaminais mamárias que são alvos potenciais para o desenvolvimento de câncer (Rosen et al., 2005).

Por isso, contracepção oral e terapia de reposição hormonal após a menopausa deve ser usado com precaução principalmente em portadores de mutação em *BRCA1*, justamente pela capacidade de *BRCA1* regular hormônios esteroides (Wiwanitkit, 2006).

Sabendo desta relação entre *BRCA1* e ER- α no desenvolvimento do câncer de mama, Zhang et al. (2005) demonstraram que as oncoproteínas E6/E7 de HPV interage diretamente com BRCA1, levando ao antagonismo de várias atividades funcionais de BRCA1. No entanto, o mecanismo pelo qual E6 e E7 inativam BRCA1 não é idêntico àquele referente à p53 ou pRb, pelo fato de BRCA1 não ser degradado em resposta a E6, como acontece com p53. A interação de E6/E7 com BRCA1 reprimam negativamente a atividade do ER- α .

Esta interação envolve pelo menos dois pontos de contato em BRCA1, um na região N-terminal que interage com o ER- α , e outro na região C-terminal. Além disso, mutações pontuais dentro dos domínios dedo de zinco de E6 e E7 inativam a ligação na região N-terminal de BRCA1 reduzindo sua capacidade em resgatar a inibição de ER- α (Wiwanitkit, 2006).

Baseado na expressão de ER- α , o câncer de mama invasivo pode ser dividido em dois subtipos no núcleo das células tumorais. Quando envolvido no estrógeno circulante, ER estimula a divisão celular e o crescimento do tumor, resultando no aumento do risco de mutações (Allred al., 2004).

A correlação entre BRCA1 e E6 / E7 se tornou uma preocupação de grande interesse no câncer ginecológico (Wiwanitkit, 2006). O esquema que resume as interações entre o gene BRCA, E6-E7 de HPV e os receptores de estrógeno é mostrado na Figura 5.

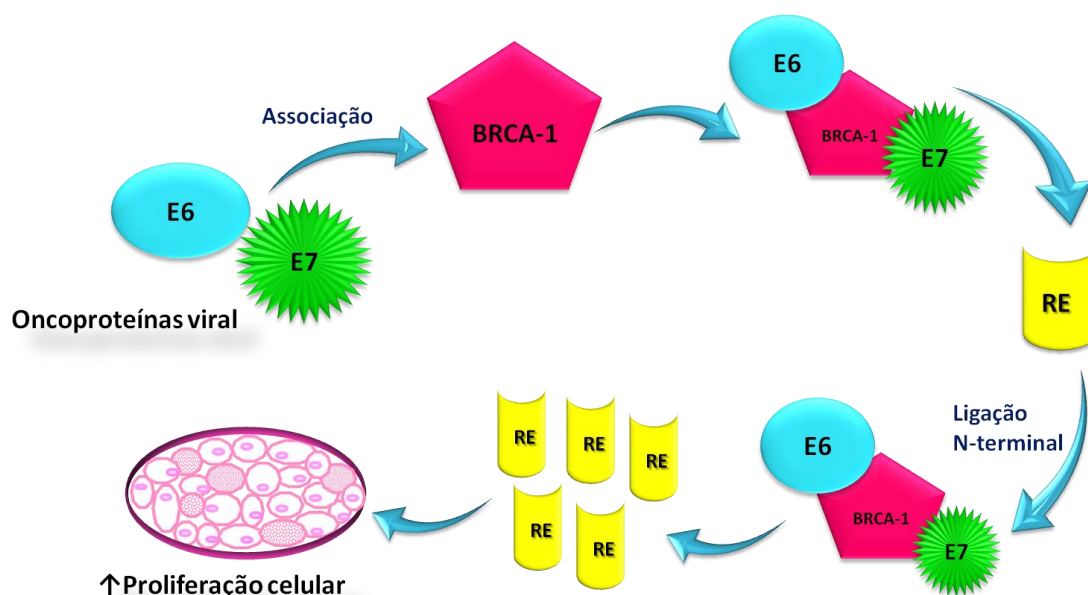


Figura 5. Diagrama esquemático mostrando o possível envolvimento das oncoproteínas virais E6/E7 associadas a BRCA1 elevando os níveis dos receptores de estrógeno (ER- α). As mutações pontuais introduzidas por associação entre as oncoproteínas E6/E7 de HPV e BRCA1 interferem na região N-terminal de BRCA1 reduzindo a capacidade de inibição de ER- α . Altos níveis de ER circulante estimulam a divisão celular e o crescimento tumoral (Autoria própria).

Embora essa associação não esteja totalmente elucidada, o avanço no conhecimento sobre a interação entre BRCA1 e as oncoproteínas E6/E7, podem colaborar consideravelmente na compreensão da carcinogênese de mama familiar, especialmente no câncer de mama associado ao vírus (Wiwanitkit, 2006).

2.3.4 Mecanismo de associação entre E6/E7 e HER-2

HER-2 (também conhecida como ErbB-2) é um receptor transmembrana que pertence à família de receptores tirosina-quinase que partilham estruturas semelhantes mas têm diferentes funções biológicas (Cole *et al.*, 2013). A superexpressão de HER-2 está associada com o desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres, especialmente o de mama (Ignatoski *et al.*, 2005), uma vez que desempenha um papel chave na transdução de sinal responsável pelo crescimento, proliferação e diferenciação celular (Iqbal e Iqbal, 2014).

HER-2 superexpresso ocorre em aproximadamente 15-30% dos cânceres de mama invasivos (Iqbal e Iqbal, 2014). Estudos têm mostrado que existe uma forte associação entre a presença de HR-HPV e o gene *HER-2*, e esta associação estaria relacionada a um tipo mais agressivo de câncer de mama (Al Moustafa *et al.*, 2004; Yasmeen *et al.*, 2007).

Um estudo utilizando como modelo experimental células epiteliais orais avaliou uma possível associação entre HPV e *HER2*. O estudo avaliou dois grupos de células, o primeiro apresentava superexpressão de HER-2 e E6/E7 positiva, o segundo grupo apenas E6/E7 positivo, com esse estudo os pesquisadores identificaram que a formação do complexo HER-2 e as oncoproteínas virais induziram a transformação neoplásica dessas células, além de aumentar o potencial transformador de HER-2 (Al Moustafa *et al.*, 2004).

O complexo E6/E7/HER-2 atua sobre a E-caderina/catenina em carcinomas humanos (Al Moustafa *et al.*, 2008). A co-expressão desse complexo diminui a expressão da E-caderina e catenina (Al Moustafa *et al.*, 2004). Isto pode ser acompanhado pela localização citoplasmática de E-caderina, assim como a translocação nuclear das cateninas. β -catenina é fosforilada por c-Src e, conseqüentemente, é translocado para o núcleo das células cancerosas. Ao entrar no núcleo dessas células, β -catenina modula a transcrição celular conduzindo ao crescimento descontrolado (Figura 6) (Al Moustafa *et al.*, 2004, Yasmeen *et al.*, 2007, Al Moustafa *et al.*, 2008).

Al Moustafa *et al.*, (2004) verificaram que E6/E7 de HR-HPV e HER-2 foram co-expresso em 40% dos casos de câncer de mama invasivo. Além disso, a interação entre E6/E7 de HPV16 e HER-2 estaria relacionada a um tipo mais agressivo e invasivos de tumores, além de transformar células cancerosa da mama não-invasivo para invasiva (Al Moustafa *et al.*, 2004). Estas evidências sugerem que o receptor HER-2 coopera com HR-HPV na tumorigênese da mama através da ativação de β -catenina (Al Moustafa *et al.*, 2004; Yasmeen *et al.*, 2007; Al Moustafa *et al.*, 2008).

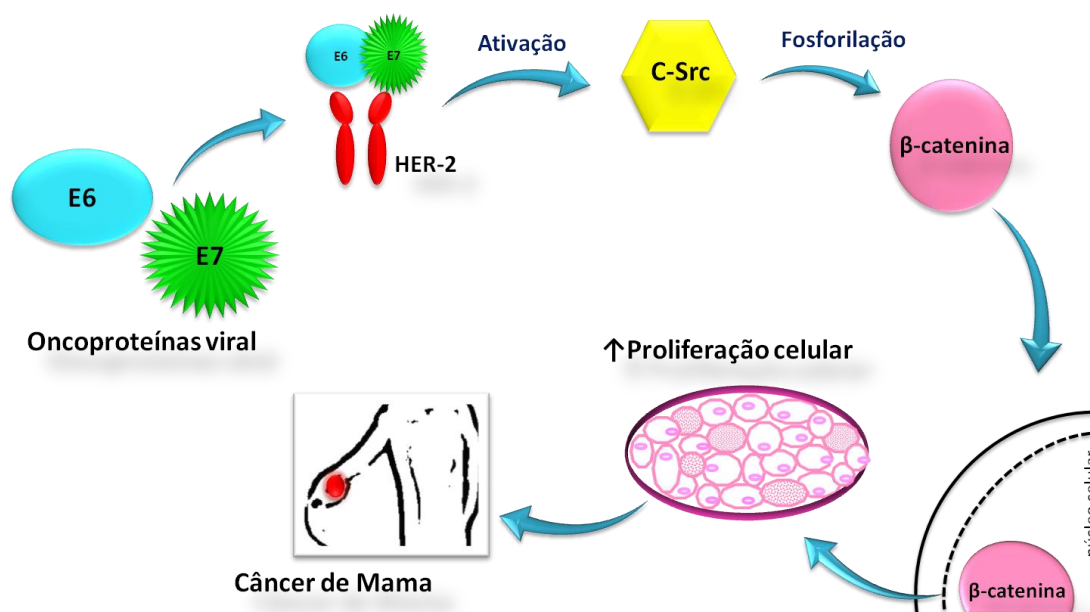


Figura 6. Diagrama esquemático mostrando a interação entre oncoproteínas virais E6/E7 e HER-2 levando ao aumento da proliferação celular. A ativação de c-SRC ocorre como resultado da associação entre E6/E7 e HER-2. c-SRC fosforila β-catenina que é translocada para o núcleo das células cancerosas. Ao entrar no núcleo dessas células, β-catenina modula a transcrição celular levando ao crescimento descontrolado das células do câncer de mama (Autoria própria).

Diversos estudos têm demonstrado evidências que o HPV pode estar envolvido na carcinogênese mamária, detectando o DNA bem como as oncoproteínas virais em carcinomas mamários e em tecidos adjacentes. Contudo, enquanto o papel etiológico do HPV no câncer de mama não for totalmente esclarecido, a presença desse vírus e sua ação carcinogênica nesses tumores não pode ser descartada. Dessa forma, existe a necessidade de investigações adicionais para compreender qual a contribuição desse vírus no desenvolvimento dessa neoplasia.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi detectar e analisar o Papilomavírus humano (HPV) em carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- 1.** Detectar e genotipar o HPV em tecido mamário fresco e parafinado de pacientes com neoplasias mamárias;
- 2.** Quantificar a carga viral do HPV em amostras HPV-positivas oriundas de tecido mamário fresco de pacientes com alterações benignas e carcinoma mamário;
- 3.** Avaliar o *status* físico do genoma viral em amostras HPV-positivas de tecido mamário fresco de pacientes com alterações benignas e carcinoma mamário;
- 4.** Detectar as oncoproteínas E6 e E7 em tecido mamário parafinado de pacientes com alterações benignas e carcinoma mamário;
- 5.** Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle entre os dados histopatológicos e a presença do DNA viral em tecido mamário fresco e parafinado.

4. Material e Métodos

4.1 Casuística

Foram utilizados no presente estudo material tecido mamário parafinado e tecido mamário fresco. Com relação ao material parafinado, foram incluídas no presente estudo amostras biológicas de sessenta e quatro mulheres com diagnóstico histológico de câncer de mama (idade média de 57,01 anos, variando de 32-101). As amostras biológicas parafinadas de tecido mamário foram retrospectivamente incluídas no estudo entre o período de junho de 2012 a dezembro de 2015. Tais amostras parafinadas são provenientes de cirurgias e foram emblocadas entre os anos de 2009 a 2014, das pacientes tratadas no Hospital Barão de Lucena (HBL), Recife, Pernambuco.

Com relação ao material fresco, foram incluídas amostras de quarenta e três mulheres com diagnóstico histológico de câncer de mama (idade média de 56,72 anos, variando de 27-78). As amostras biológicas de tecido mamário fresco foram coletadas entre o período de junho de 2012 a dezembro de 2015.

Além disso, também foram incluídos no estudo como grupo controle quarenta e seis mulheres com alterações benignas (fibroadenoma e adenose) na mama (idade média de 43,63 anos, variação 16-67).

A classificação histológica do tecido mamário utilizada no presente estudo está em consonância com classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS).

4.2 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, sob os números CAAE: 28508614.9.0000.5208 e 28508614.9.0000.5208 (Anexo 1).

As pacientes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e benefícios da sua participação no estudo. Todas as pacientes que concordaram em participar desse estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Anexo 2) e responderam a anamnese (Anexo 3). A anamnese incluiu informações sobre residência, histórico clínico, escolaridade, uso de contraceptivo, tabagismo, etilismo, entre outros.

4.3 Material biológico analisado

Foram obtidos setenta e quatro blocos de carcinomas embebidos em parafina de paciente com câncer de mama do Departamento de Anatomia-patológica do HBL. Fragmentos dos blocos foram analisados pelo patologista do serviço de saúde. Cinco secções espessas 5µm foram coletadas em tubos estéreis. Todas as amostras parafinadas de pacientes com câncer de mama tinham informações dos receptores de estrógeno, progesterona e HER-2, determinadas anteriormente por imunohistoquímica.

O tecido mamário fresco foi obtido a partir do exame de *core biopsy* de pacientes com câncer de mama e pacientes com alterações benigna (que não mostraram nenhuma anormalidade histológica), utilizadas como grupo controle, provenientes do Setor de Imaginologia do Hospital das Clínicas-UFPE.

Imediatamente após o procedimento, o material coletado foi armazenado em RNAlater Solution (Ambion®) a -80°C.

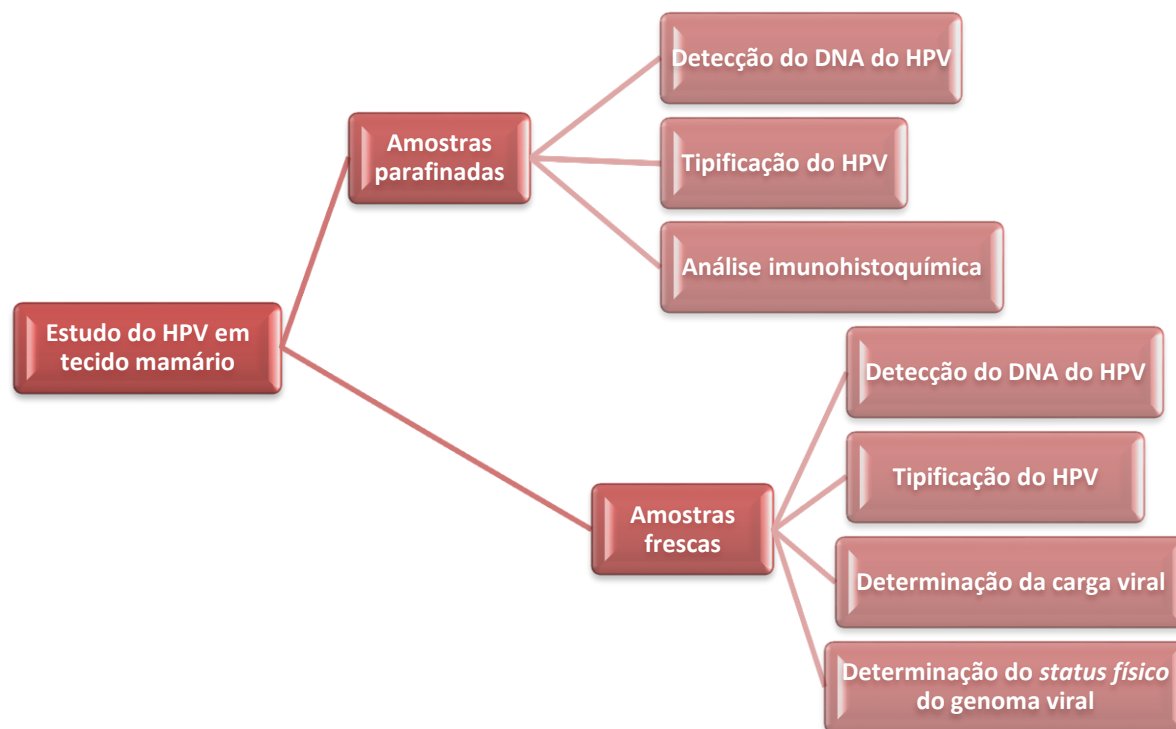


Figura 7. Desenho esquemático sintetizando as etapas cruciais do estudo. O esquema mostra as principais etapas da metodologia do estudo.

4.4 Extração do DNA

O DNA do tecido mamário parafinado foi extraído utilizando QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Já o DNA do tecido mamário fresco foi extraído utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), também seguindo as instruções do fabricante.

A qualidade do DNA foi confirmada por PCR, amplificando um fragmento de 110 pares de base (pb) do gene da β -globina, utilizando os primers especificados na Tabela 3. As condições da PCR foram as seguintes: 95°C durante 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a

72°C; e extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em um gel de agarose 2%, por 30 minutos a 100 volts e corado em brometo de etídio.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos.

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Referência
β-globina			Baldez, <i>et al.</i> , (2009)
PC04	ACACAACTGTGTTCACTAGC	110pb	
GH20	CAACTTCATCCACGTTCCACC		
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	450pb	Manos <i>et al.</i> , 1989
MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG		
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	110pb	de Roda
GP6	GAAAAATAAACTGTAAATCA		Husman <i>et al.</i> , 1995
E6 HPV-16			Peitsaro <i>et al.</i> , 2002
Senso	GAGAACTGCAATGTTTCAGGACC	81pb	
Anti-senso	TGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGTGC		
E2 HPV-16			Peitsaro <i>et al.</i> , 2002
Senso	AACGAAGTATCCTCTCCTGAAATTATTAG	76pb	
Anti-senso	CCAAGGCGACGGCTTTG		
β2-Microglobulina			Störmer <i>et al.</i> , 2009
β2MG F	TGAGTATGCCTGCCGTGTGA	105pb	
β2MG R	ACTCATACACAACCTTCAGCAGCTTAC		

4.5 Detecção do DNA viral

Apresença do DNA do HPV foi verificada pela amplificação com dois conjuntos de oligonucleotídeos. A primeira etapa foi realizada com o conjunto de primers degenerados MY09 e MY11 (Tabela 3), amplificando um fragmento de aproximadamente 450 pb na região altamente conservada do gene L1, utilizando as mesmas condições da PCR realizada com β-globina (descrita no item 4.4). Posteriormente, foram realizadas Nested-PCRs, utilizando os oligonucleotídeos GP5 e GP6, gerando um fragmento de 140pb aproximadamente. Esse sistema de iniciadores detecta mais que 23 tipos de HPVs oncogênicos e não-

oncogênicos (de Roda Husman *et al.*, 1995). Uma amostra com câncer cervical HPV-positiva foi utilizada como controle positivo em todas as reações de PCR. As condições da PCR para os primers GP5/6 foram as seguintes: denaturação inicial por 5 minutos a 94°C; seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 44°C, 1 minuto e meio a 72°C; e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio.

4.6 Genotipagem

As amostras positivas para o DNA do HPV foram tipificadas por sequenciamento a partir dos oligonucleotídeos GP5/6. Os produtos de PCR foram sequenciados pelo método de dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®, CA, USA).

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

4.7 Imunohistoquímica

Nas amostras positivas para o DNA do HPV, foi realizado imunohistoquímica para avaliar a presença das oncoproteínas E6 e E7. Tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina foram seccionados (5µm) e com

estes cortes foram montados em lâminas silanizadas (Starfrost®). O material foi desparafinado em xilol e reidratado com uma série decrescente de álcool (Lopes *et al.*, 2005). Em seguida, o material foi lavado em água corrente e em tampão fosfato de sódio (PBS) por 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão de citrato (10mM com pH6) em panela de pressão elétrica por 2 minutos. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a temperatura ambiente (Pedroso *et al.*, 2008). Foi realizado o bloqueio das peroxidases endógenas com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e metanol (1:1) por 30 minutos, as lâminas foram lavadas em água corrente e em PBS. Para inibir as ligações inespecíficas, foi feito bloqueio com a solução de soro albumina bovina BSA a 1% (SIGMA®) durante 1 hora em câmara úmida. O anticorpo primário foi incubado usando câmara úmida, por 2 horas em estufa a 37°C. A relação dos anticorpos utilizados está descrita na tabela 4.

Foi utilizado o sistema de revelação livre de biotina e conjugado com HRP (Reveal Polyvalent HRP. SPB-999. Spring Bioscience©) por 20 minutos cada reagente, em temperatura ambiente. Entre estas etapas as lâminas eram lavadas com PBS. A reação foi revelada com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™), as lâminas foram lavadas com água destilada e contracoradas com hematoxilina. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcool e xilol e montadas com entelan e lamínula.

Tabela 4. Descrição dos anticorpos primários utilizados na Imunohistoquímica.

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição
HPV16 E6 + HPV18 E6	289-13965	Abcam®	1:200
HPV16 (E7)	289-17013	Abcam®	1:500
p53	DO-1	Santa Cruz Biotechnology®	1:300
p16 ^{INK4a}	G175-405	Zeta Corporation®	1:400

A análise foi feita com o sistema de microscopia óptica e microcâmera Axion Image 2 (Carl Zeiss®), inicialmente por constatação de reatividade (qualitativamente), com descrição se a reatividade está localizada no citoplasma ou núcleo. Uma segunda análise foi realizada estimando o percentual de células positivas de forma semiquantitativa em menor aumento (40x). Foi analisado o percentual de células neoplásicas coradas. Os casos foram graduados conforme o seguinte critério: 0 - negativa: < 5% de células; 1 - positividade fraca: 5% a 20% das células; 2 - positividade moderada: 21% a 50% das células; 3 - positividade forte: > 50%. Foram utilizados apenas 4 casos do grupo controle (tecido mamário com alterações benignas) como controle negativo nas reações de IHQ, sendo incluídas em cada ensaio.

4.8 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Visando determinar o estado físico e carga viral do HPV-16, foram realizadas PCRs em tempo real (qPCR) utilizando o sistema Sybr Green. A amplificação foi realizada no volume de 20µl, contendo 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) e oligonucleotídeos que amplificam regiões de E6 e E2 de HPV-16 (tabela 3) a 300nM. Nas reações foi utilizado o aparelho ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems®). As condições da PCR foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, e 50 ciclos com duas etapas de 95°C durante 15s, e 60°C durante 60s durante (adaptado de Peitsaro *et al.*, 2002).

Como controle foram utilizadas diluições do genoma completo de HPV-16 clonado no vetor pBR-322, que continha de 86 a 862 milhões de cópias por reação, servindo como um padrão para curvas de calibração para os genes E2 e

E6. O controle positivo das reações foi o DNA extraído das linhagens celulares CaSki (400–600 cópias por célula) e SiHa (1-2 cópias de HPV16 integrado por célula), usadas para controlar a precisão e reprodutibilidade das curvas padrão estimadas para carga de HPV.

Além disso, foi utilizado um gene endógeno, β 2-microglobulina, como normalizador para qPCR. O gene da β 2-microglobulina foi utilizado para ajustar as diferenças na quantidade de DNA genômico de entrada entre as amostras. Uma série de diluições (10^1 a 10^6) foi utilizada para gerar a curva padrão. Carga viral normalizada foi calculada dividindo o número de cópias de HPV pelo o número de cópias β 2-microglobulina (com base em 2 cópias de β 2-microglobulina por célula) e foi expressa como cópias de vírus por célula de equivalentes, de acordo com a fórmula descrita (Carcopino *et al.* 2006):

$$CargaviralHPV(cópias/célula) = \frac{Número de cópias HPV \times 10^4}{\frac{Número de cópias de \beta 2 - microglobulina}{2}}$$

Uma vez construídas curvas de calibração para cada tipo de células e de controle, foram analisadas as amostras em duplicata.

A carga viral foi determinada a partir dos níveis do gene presente tanto na forma episomal quanto integrada, nesse caso, E6. As cargas virais de cada amostra foram expressas como o número de cópias de E6 de HPV por 10^4 células.

O estado de integração foi calculado dividindo número de cópias de E2 (episomal) do número de cópias total de E6 (episomal e integrado). A razão de E2/E6 <1 indica a presença de ambas as formas (episomal e integrado); valores >1 indicam predominância da forma episomal. Na ausência de E2, ou seja, E2=0 sugere que o vírus está integrado ao genoma do hospedeiro.

4.9 Análise Estatística

Foram realizadas análises estatísticas para avaliar a frequência de HPV em relação as características clínico-patológicas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software online Social Science Statistics (disponível no site <http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/Default2.aspx>) com aplicação do teste qui-quadrado (X^2). No teste aplicado, foi considerado o nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. Resultados

5.1 Caracterização das amostras

Foram analisados nesse estudo 107 amostras de carcinomas mamários provenientes de pacientes com câncer de mama, com idades entre 27 e 101 anos, com uma média de 57,5 anos. Além disso, foram incluídas como grupo controle 46 amostras de tecido mamário com alterações benignas, com idades entre 16 e 67 anos, com uma média de 43,6 anos.

5.2 Análise de detecção do DNA do HPV em tecido mamário

Visando avaliar a qualidade do DNA das amostras, foram realizadas PCRs que amplificam o gene β -globina. Todas as amostras incluídas no estudo foram positivas para a β -globina, indicando que o DNA estava disponível para a análise molecular.

Posteriormente, todas as amostras foram examinadas usando oligonucleotídeos de amplo espectro MY09/MY11 para detecção de HPV. No entanto, não houve amplificação nas amostras analisadas. Subsequentemente, foi analisado *nested* PCR a partir do MY09/11 com os iniciadores degenerados GP5/6, amplificando um fragmento de aproximadamente 110pb da região L1. O DNA do HPV foi positivo em 46,7% (50/107) espécimes de câncer da mama. Além disso, 21,7% (10/46) amostras do grupo controle também foram positivas para o DNA do HPV, como observado no gráfico 1.

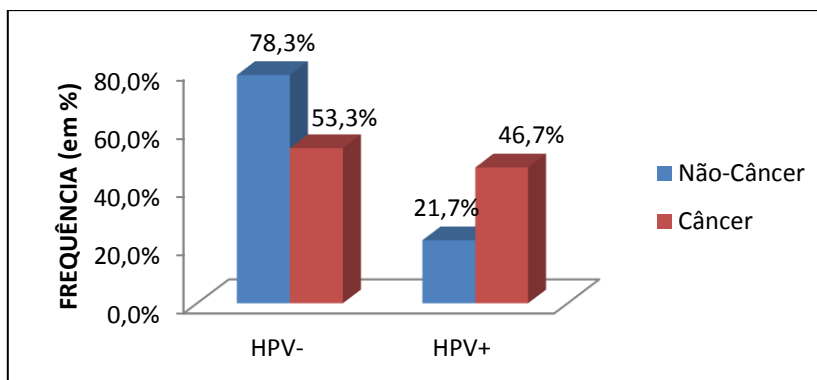


Gráfico 1. Frequência do HPV nas amostras de câncer de mama e no grupo controle (não câncer). Foi observada uma frequência de 46,7% do HPV em tumores maligno mamário e de 21,7% no grupo controle (não-câncer).

A maioria [97,2% (104/107)] dos carcinomas de mama avaliados nesse estudo foram do tipo invasivo. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativa quando comparado a presença do DNA viral e a invasividade do tumor ($p= 0.637$) (Tabela 5). A frequência do DNA do HPV foi maior em carcinomas invasivos (49/104) das amostras, e menor nos carcinomas *in situ* (não-invasivo) (1/3) das amostras (Tabela 5).

Com relação às idades das pacientes incluídas no estudo, o DNA do HPV foi mais prevalente em pacientes com câncer de mama com idade igual ou superior a 60 anos, apresentando positividade em 46,7% (28/60) das amostras.

Tabela 5: Frequência do HPV comparada a fatores clínico-patológicos em carcinomas mamários.

	TODOS OS CASOS N(%)	HPV- NEGATIVO N(%)	HPV- POSITIVO N(%)	χ^2	p-value
<i>Número de casos frescos</i>	107 (100%)	57 (53,3%)	50 (46,7%)		
<i>Invasividade tumoral</i>					
Invasivo	104 (100%)	55 (52,9%)	49 (47,1%)	0.222	0.637
Não-invasivo	3 (100%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
<i>Idade (anos)</i>					
<40	11 (100%)	5 (45,5%)	6 (54,5%)	1.429	0.698
40–49	19 (100%)	9 (47,4%)	10 (52,6%)		
50–59	17 (100%)	11 (64,7%)	6 (35,3%)		
≥60	60 (100%)	32 (53,3%)	28 (46,7%)		
<i>Tipo histológico</i>					
Ductal	100 (100%)	54(54%)	46 (46%)	6.320	0.176
Lobular	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)		
Mucinoso	3 (100%)	0 (0%)	3 (100%)		
Apócrino	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)		
Micropapilar	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)		
Doença de Paget	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)		

Foi possível detectar na população estudada seis tipos histopatológicos de câncer de mama, nomeadamente os tipos ductal, lobular, mucinoso, apócrino, micropapilar e paget. Dentre estes, o câncer de mama ductal foi o tipo histopatológico mais prevalente em nosso estudo. Além disso, foi observado um percentual de 46% (46/100) dos carcinomas eram do tipo ductal e HPV-positivos (Gráfico 2).

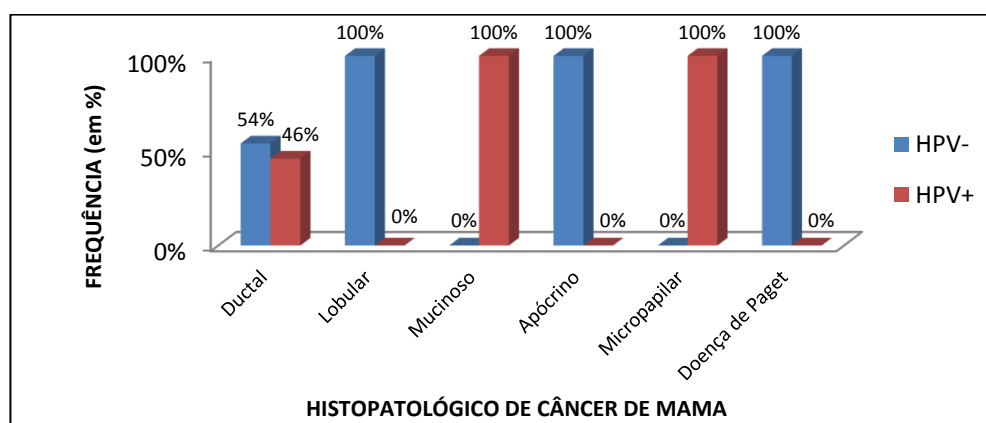


Gráfico 2. Frequência do DNA de HPV nos tipos histopatológicos de câncer de mama. Dos seis tipos histopatológicos identificados no estudo apenas três tipos apresentaram a presença do DNA viral, sendo o tipo ductal (46%) mais frequente na população estudada. Seguido pelos tipos mucinoso (100%) e micropapilar (100%).

A presença do DNA viral também foi comparada aos aspectos clínico-patológicos informadas na anamnese, realizadas nas pacientes com câncer de mama que fizeram *corebiopsy*. Contudo, vale ressaltar que essa comparação só foi possível de ser realizada nas amostras biológicas frescas, uma vez que só foi possível aplicar a entrevista nestas pacientes. A presença do DNA viral foi comparada com o histórico familiar para câncer de mama, no entanto, nenhuma paciente HPV-positiva relatou possuir histórico familiar desse carcinoma. Na comparação entre a presença do HPV e pacientes em menopausa, utilização de anticoncepcionais e realização de exame de rastreio (mamografia), a frequência do DNA viral foi de 37% (10/14), 30,8% (4/14) e 29,4% (5/14) dos casos respectivamente (Tabela 6). Contudo, não foram observadas associações significativas em nenhum dos aspectos clínico-patológicos e a presença do DNA do HPV nas amostras analisadas (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência de casos HPV-positivos comparada a fatores clínico-patológicos em carcinomas mamários.

	TODOS OS CASOS N(%)	HPV- NEGATIVO N(%)	HPV- POSITIVO N(%)	χ^2	p-value
<i>Número de casos</i>	43 (100%)	29 (67,4%)	14 (32,6%)		
<i>Histórico familiar</i>					
Sim	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	1.556	0.212
Não	40 (100%)	26 (65%)	14 (35%)		
<i>Menopausa</i>					
Sim	27 (100%)	17 (63%)	10 (37%)	0.662	0.415
Não	16 (100%)	12 (75%)	4 (25%)		
<i>Uso anticoncepcional</i>					
Sim	13 (100%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0.027	0.986
Não	18 (100%)	12 (66,7%)	6 (33,3%)		
Não soube informar	12 (100%)	8 (66,7%)	4 (33,3%)		
<i>Mamografia</i>					
Sim	17 (100%)	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0.1268	0.721817
Não	26 (100%)	17 (65,4%)	9 (34,6%)		

χ^2 = Teste qui-quadrado.

As amostras HPV-positivas, oriundas tanto do material fresco como parafinado, foram sequenciadas para identificação dos tipos de HPV nos

carcinomas avaliados. Foram identificados nesse estudo seis genótipos de HPV, nomeadamente o HPV6, 16, 18, 31 e 58, sendo o HPV16 o mais prevalente. A frequência de HPV16 nesse estudo foi de 92% (46/50) dos casos estudados, seguido pelos tipos de alto risco, HPV31 e 58, com 2% (1/1) dos casos respectivamente, e pelo genótipo considerado de baixo risco, HPV6, também com 2%(1/1) dos casos analisados (gráfico 3).

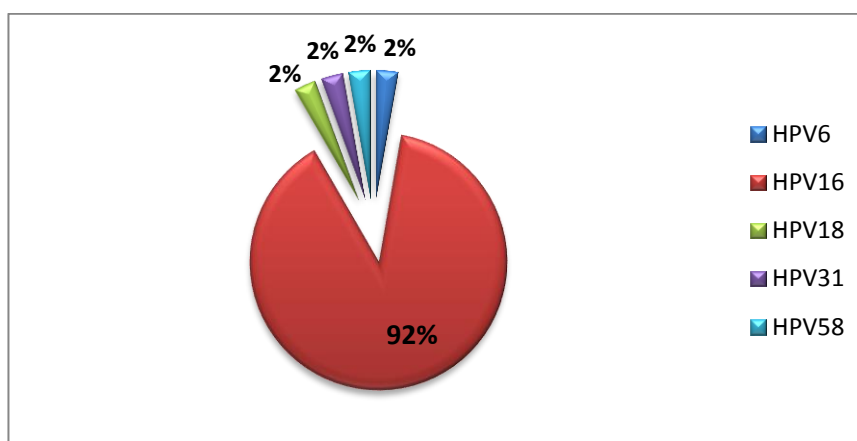


Gráfico 3. Frequência dos genótipos de HPV nos carcinomas mamário. Dos cinco genótipos de HPV identificados nesse estudo, o tipo mais prevalente foi o HPV16, em vermelho, presente em 92% das pacientes HPV-positivas.

A presença do HPV também foi associada a expressão dos receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) e HER-2. No entanto, não foi possível obter as informações desses receptores do tecido mamário fresco. Portanto, as análises com relação aos receptores foram realizadas apenas nas amostras parafinadas. Consequentemente, a caracterização molecular que depende da expressão desses receptores também ficou restrita a esse grupo de amostras. Dessa forma, a associação entre pacientes com câncer de mama HPV-positiva e a expressão de ER ($p=0.241$), PR ($p=0.241$) e HER-2 ($p=0.434$) não foi estatisticamente significativa, como mostrado na tabela 7.

Tabela 7: Frequência do HPV comparada a fatores clínico-patológicos em carcinomas mamários.

	TODOS OS CASOS N(%)	HPV-NEGATIVO N(%)	HPV-POSITIVO N(%)	χ^2	p-value
<i>Número de casos parafinados</i>	64 (100%)	28 (43,75%)	36 (56,25%)		
<i>Classificação molecular</i>					
Luminal	37 (100%)	15 (40,5%)	22 (59,5%)	1.389	0.499
Super HER-2	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)		
Tripla-negativo	23 (100%)	12 (52,2 %)	11 (47,8%)		
<i>Expressão ER</i>					
Sim	35 (100%)	13 (37,1%)	22 (62,9%)	1.370	0.241
Não	29 (100%)	15 (51,7%)	14 (48,3%)		
<i>Expressão PR</i>					
Sim	35 (100%)	13 (37,1%)	22 (62,9%)	1.370	0.241
Não	29 (100%)	15 (51,7%)	14 (48,3%)		
<i>Expressão HER-2</i>					
Sim	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)	0.609	0.434
Não	60 (100%)	27 (45%)	33 (55%)		

χ^2 = Teste qui-quadrado; ER - receptor de estrogênio; PR - receptor de progesterona.

Das 36 amostras parafinadas HPV-positivas, 62,9% (22/35) dos casos foram positivos para o receptor de estrogênio e progesterona, respectivamente, e 75% (3/4) das amostras positivas para HER-2, conforme mostrado no gráfico 4.

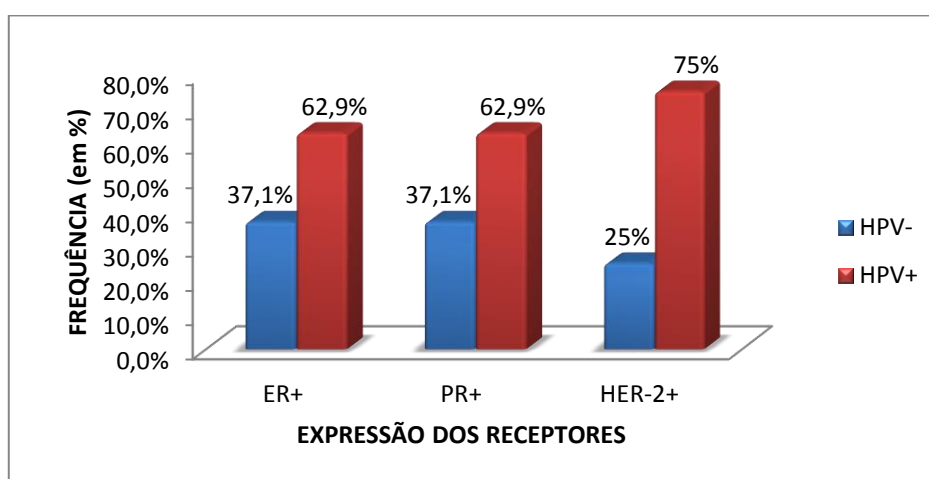


Gráfico 4. Frequência do HPV em carcinomas positivos para ER, PR e HER-2. Alta prevalência do DNA de HPV (em vermelho) tanto nos receptores hormonais quanto em HER-2.

Quando comparada a expressão desses receptores (ER, PR e HER-2) com os genótipos de HPV, os HPVs de alto foram os mais prevalentes (Gráfico 5). As

pacientes positivas para ER e PR apresentaram apenas HPV de alto risco, sendo o HPV16 o mais frequente, com 86,5% dos casos (19/22), seguidos dos HPV18, 31 e 58 com 4,5% das amostras (1/22) respectivamente. Pacientes HER-2 positivas apresentaram 33,3% dos casos (1/3) HPV6, e 66,7% das amostras (2/3) HPV16.

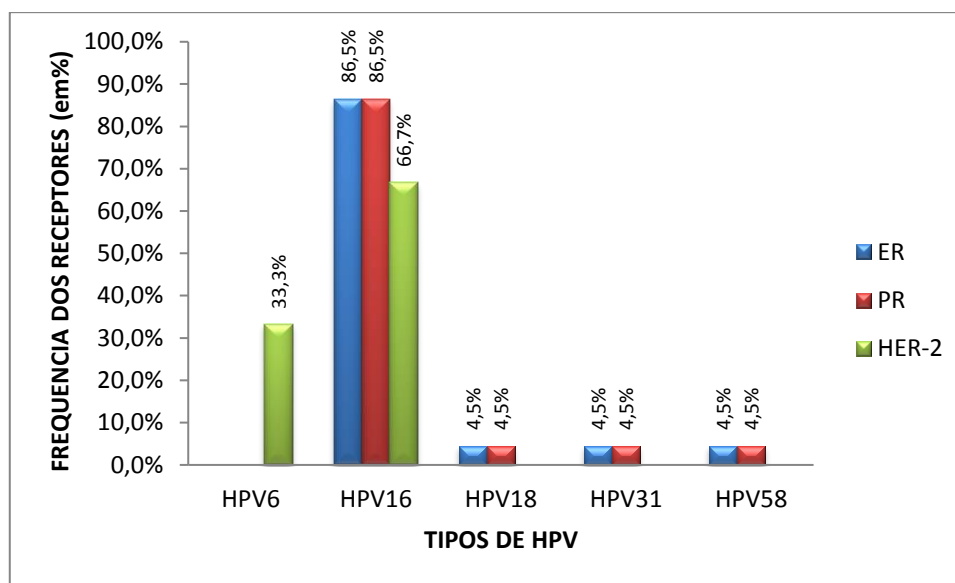


Gráfico 5. Frequência dos genótipos de HPV nos receptores hormonais e HER-2. Prevalência do genótipo de HPV16 em todos os receptores analisados (ER, PR e HER-2).

Com a informação dos receptores, pode-se avaliar a classificação molecular do câncer de mama nas amostras parafinadas. Assim, foi observado que um percentual de 61,1% (22/36) dos carcinomas do tipo luminal apresentou DNA de HPV. A presença do DNA viral também foi detectada no tipo super HER-2 8,3% (3/36) dos casos apresentando genótipos de baixo e alto risco, HPV6 com 33,3% (1/3) dos casos e HPV16 com 66,7% (2/3) dos casos avaliados. Nos tumores malignos classificados como triplo negativo, 30,6% (11/36) das amostras foram HPV-positivas, entretanto. Curiosamente os tumores malignos classificados como triplo negativo e HPV-positivas apresentaram um único genótipo de alto

risco oncogênico, o HPV16, detectado em 100% (11/11) dos carcinomas de mama (Gráfico 6).

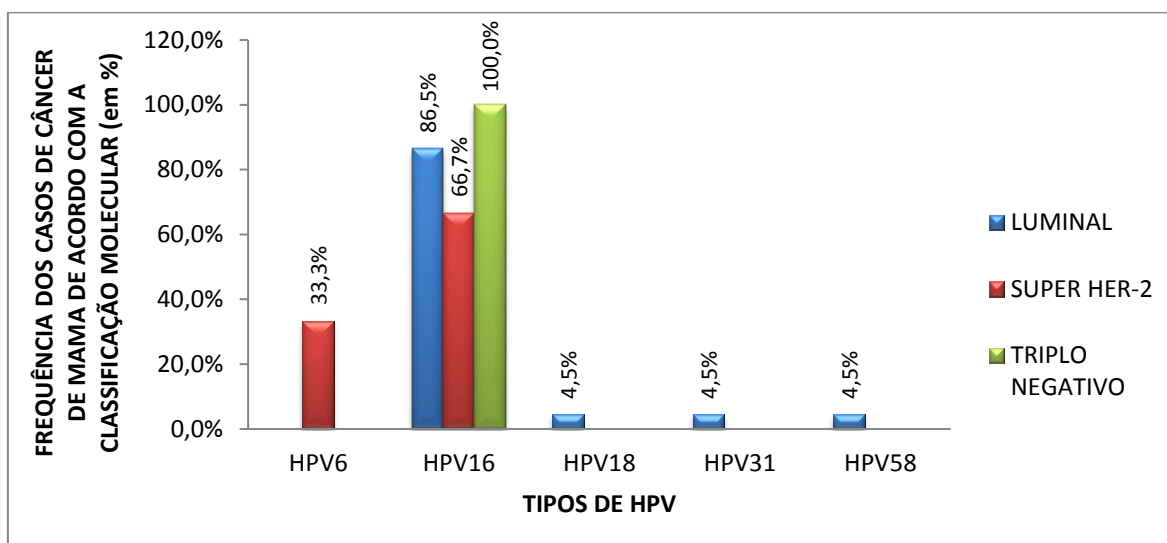


Gráfico 6. Frequência dos genótipos de HPV em carcinomas mamários de acordo com a classificação molecular. Prevalência do HPV16 nos três tipos de câncer de mama classificados de acordo com características moleculares.

*Luminal: ER(+)/PR(+)/HER2(-); Super HER2: ER(-)/PR(-)/HER2(+); TNBC: ER(-)/PR(-)/HER2(-).

5.3 Carga viral e Determinação do *status* físico do HPV

Além da detecção do DNA do HPV, foi avaliada a quantificação de E6 para estimar a quantidade de DNA do HPV presente nas amostras de mama. Pelo fato da quantidade de DNA parafinado ser pequena essa análise foi possível apenas nas amostras frescas.

Todos os tumores malignos de mama frescos HPV-positivos foram submetidos à análise por PCR quantitativa em tempo real para determinar a carga viral e o estado físico do HPV16. Foram incluídas nessa análise 10 amostras do grupo controle (não-câncer) HPV-positivas, além das linhagens celular SiHa e CaSki, como controle positivo. O número de cópias dos genes *E2* e *E6* de HPV16 por 10^4 células, e a razão de *E2* por *E6*, implicado no estado físico viral, estão compilados nas tabelas 8 e 9. A média do número de cópias de *E6* HPV16 em

10^4 células foi de 14,2 em tumores maligno de mama e de 14,4 em tecido mamário benigno. *E2* não foi detectado dos carcinomas mamários em 57,1% (8/14) dos casos, sendo detectado apenas em 42,9% (6/14) dos casos.

Tabela 8. Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do *status* físico em carcinoma mamário HPV-positivo.

AMOSTRA	GENÓTIPO	CARGA VIRAL		ESTADO FÍSICO	
		Nº de cópias E2 por 10^4	Nº de cópias E6 por 10^4	E2/E6	Estado
HC09	HPV16	5,40	13,76	0,39	Misto
HC14	HPV16	1,37	14,49	0,09	Misto
HC21	HPV16	0,00	5,49	0,00	Integrado
HC23	HPV16	0,77	6,90	0,11	Misto
HC25	HPV16	67,78	118,80	0,57	Misto
HC44	HPV16	1,68	2,35	0,72	Misto
HC45	HPV16	0,00	3,70	0,00	Integrado
HC49	HPV16	0,00	4,21	0,00	Integrado
HC55	HPV16	0,00	1,99	0,00	Integrado
HC60	HPV16	0,00	3,43	0,00	Integrado
HC64	HPV16	52,90	8,37	6,32	Epissomal
HC67	HPV16	0,00	11,59	0,00	Integrado
HC77	HPV16	0,00	2,48	0,00	Integrado
HC78	HPV16	0,00	1,55	0,00	Integrado
SiHa	HPV16	145,09	422559,33	0,00	Integrado
CaSki	HPV16 e 18	48388290,0574587	35023354,4257764	1,38	Epissomal

Já em tecido mamário benigno, *E2* foi detectado em 50% (5/10) dos casos, nos outros 50% (5/10) dos casos não foi possível a detecção de *E2* (Tabela 9).

No que diz respeito ao *status* físico a proporção *E2* / *E6* foi maior nos pacientes com alteração benigna quando comparada as pacientes com câncer de mama. Vale salientar que $E2/E6 > 1$ foi considerado o vírus na forma epissomal. Em tumores malignos de mama, 7,2% (1/14) dos casos estavam na forma epissomal, 57,2% (8/14) das amostras apresentaram a forma integrada, e 35,7% (5/14) das amostras continham a forma mista. Já nas pacientes do grupo controle

(alterações benignas) a forma epissomal foi encontrada em 20% (2/10) dos casos, sendo a forma integrada predominante, em 50% (5/10) das amostras, seguido pela forma mista com 30% (3/10) dos casos.

Tabela 9. Quantificação da carga viral de HPV16 e avaliação do *status* físico em tecido mamário benigno (não-câncer) HPV-positivo.

AMOSTRA	GENÓTIPO	CARGA VIRAL		ESTADO FÍSICO	
		Nº de cópias E2 por 10 ⁴	Nº de cópias E6 por 10 ⁴	E2/E6	Estado
HC17	HPV16	0,00	76,68	0,00	Integrado
HC31	HPV16	0,00	3,83	0,00	Integrado
HC36	HPV16	33,99	9,50	3,58	Epissomal
HC43	HPV16	0,00	7,01	0,00	Integrado
HC50	HPV16	0,58	2,69	0,22	Misto
HC52	HPV16	41,90	10,69	3,92	Epissomal
HC57	HPV16	0,00	143549,09	0,00	Integrado
HC58	HPV16	26,80	51,41	0,52	Misto
HC69	HPV16	0,00	10,47	0,00	Integrado
HC81	HPV16	0,58	1,80	0,32	Misto

5.4 Detecção das oncoproteínas virais em tecido mamário

No presente estudo também foram executadas análises de detecção das oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV16 nos tumores malignos mamários parafinados HPV-positivos, por imunohistoquímica. Portanto, foram incluídos para essa análise apenas 36 carcinomas de mama HPV-positivos parafinados e quatro casos controle (alteração benigna). Além da detecção das oncoproteínas E6 e E7 de HPV, as amostras parafinadas foram avaliadas quanto a presença de p53 e p16^{INK4a}, utilizando anticorpos específicos para esse supressor tumor por IHQ.

A tabela 10 apresenta a frequência de HPV, nos carcinomas mamários e no grupo controle HPV-positivos, nas amostras que detectaram as proteínas analisadas por IHQ, incluindo os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama.

Tabela 10. Frequência da expressão das oncoproteínas virais (E6/E7) e supressores tumorais (p53/p16^{INK4a}), em amostras HPV-positivas.

MARCADORES	TODOS OS CASOS N(%)	NÃO-CÂNCER N(%)	CÂNCER N(%)	χ^2	p-value	OR (95% IC)
Número de casos	40 (100%)	4 (10%)	36 (90%)			
<i>Oncoproteína E6</i>						
Positiva	38 (100%)	4 (10,5%)	34 (89,5%)	0.233	0.628	1.533 (0.06 - 37.29)
Negativa	2 (100%)	0 (0%)	2 (100%)			
<i>Oncoproteína E7</i>						
Positiva	40 (100%)	4 (10%)	36 (90%)	-	-	8.111 (0.14 - 461.13)
Negativa	0 (100%)	0	0			
<i>Supressor de tumor p53</i>						
Positiva	23 (100%)	1 (4,3%)	22 (95,7%)	1.921	0.165	4.714 (0.44 - 49.94)
Negativa	17 (100%)	3 (17,6%)	14 (82,4%)			
<i>Supressor de tumor p16^{INK4a}</i>						
Positiva	13 (100%)	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0.114	0.735	1.500 (0.14 - 15.99)
Negativa	27 (100%)	3 (11,1%)	24 (88,9%)			

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

P<0.05 = estatisticamente significante

As IHQ foram realizadas em 10% (4) das amostras do grupo controle, ou seja, tecido mamário com alteração benigna (não-câncer), e em 90% (36) das amostras parafinadas com câncer de mama, positivas para HPV por PCR. Foi observado que a expressão de E6 ocorreu concomitantemente com a presença do HPV em 89,5% (34/36) das amostras tumorais, com marcação predominante no citoplasma. No grupo controle, onde a presença do DNA viral também foi detectada, foi observada a detecção da oncoproteína E6 em 10,5% (4/4) dos casos analisados (Figura 8).

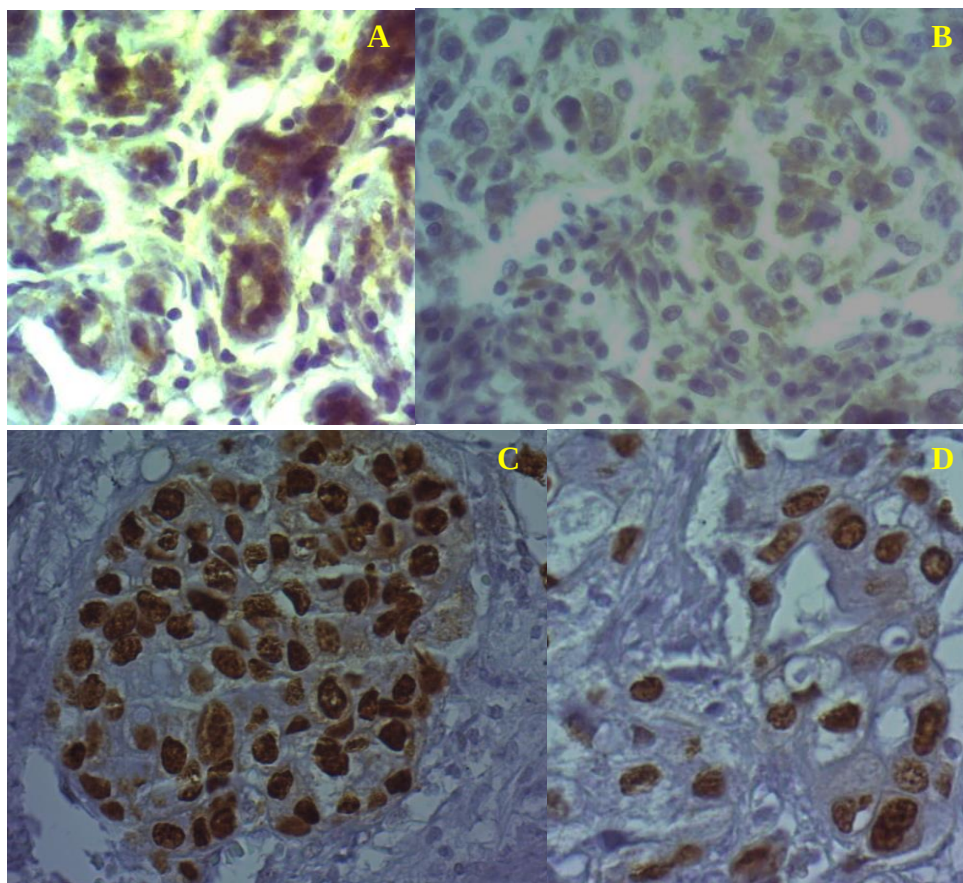


Figura 8. Representação da imunomarcação de E6, E7, p53 e p16^{INK4A} em carcinoma ductal invasivo. Imunomarcação das proteínas E6, E7, p53 e p16^{INK4A} em carcinoma ductal HPV positivo, por imunohistoquímica (aumento de 400X). **a.** E6 positivo; **b.** E7 positivo; **c.** p53 positivo; **d.** p16^{INK4A} positivo.

Com relação à proteína E7, a imunomarcação foi observada em 90% (36/36) dos tumores malignos HPV-positivos. A marcação foi ressaltada igualmente tanto nos núcleos quanto no citoplasma das células tumorais.

Já a proteína p53 mostrou-se de forma diferenciada no padrão de marcação. No grupo controle, apenas com alteração benigna (não-câncer), a imunomarcação foi nuclear e citoplasmática, enquanto nas amostras com carcinoma mamário, a marcação ficou localizada na região citoplasmática. A p53 foi observada em 95,7% (22/36) dos tumores malignos de mama HPV-positivas e em apenas 4,3% (1/4) dos casos do grupo controle (não-câncer).

A proteína p16^{INK4A} positiva em 92,3% (12/36) dos espécimes de câncer de mama HPV-positivas, apresentou marcação predominantemente nuclear. Enquanto no grupo controle, apenas 7,7% (1/4) das amostras HPV-positivas detectaram p16^{INK4A}.

Embora o anticorpo para E6 seja específico HPV16, e o de E7 para HPV16 e 18, aumentando as possibilidades de detectar proteínas de outros genótipos de HPV, foi possível detectar E6 e E7 em todos os genótipos identificados por PCR. Quando comparado à detecção das proteínas E6, E7, p53 e p16^{INK4a} nas amostras HPV-positivas com os genótipos de HPV, foi constatado que todos os genótipos de HPV, identificados nesse estudo, expressaram E6, E7 e p53. Já p16^{INK4A} foi observado apenas em HPV16. Por ser o genótipo mais frequente, o HPV16 foi o tipo com maior marcação dessas proteínas como podemos observar no Gráfico 7.

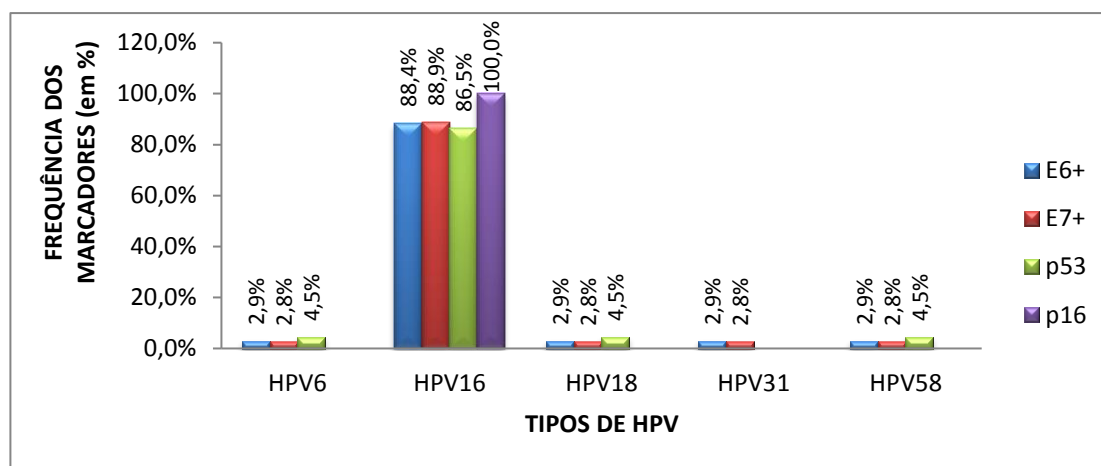


Gráfico 7. Frequência dos genótipos de HPV nos carcinomas que expressaram os supressores de tumor p53 e p16^{INK4A} e as oncoproteínas virais E6 e E7. Prevalência das proteínas E6, E7, p53 e p16^{INK4A} nos carcinomas identificados com HPV16. p53 não foi identificada apenas em carcinomas com HPV31. p16 foi detectada apenas em único genótipo.

6. Discussão

O papel etiológico do HPV em alguns cânceres extragenitais está sob intenso debate (Al Moustafa *et al.*, 2004; Aguayo *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2009). Neste estudo, a presença do HPV foi observada em mulheres com câncer de mama pela primeira vez no Nordeste Brasil. Os resultados desse estudo mostraram que a prevalência de HPV em carcinoma de mama foi relativamente alta, uma vez que esse vírus estava presente em 46,7% (50/107) dos casos analisados.

Nossos resultados estão em consonância com estudos anteriores em diversas regiões do mundo, que também descreveram uma proporção similar dos casos positivos. No Japão foi observado DNA de HPV em 19% das amostras (Khan *et al.*, 2008), no Irã a presença do vírus em carcinomas mamários foi de 25,9% no Norte e de 34,6% na capital (Sigaroodi *et al.*, 2009; Hossein *et al.*, 2013). Em consonância com estes resultados, Li e colaboradores (2011), realizaram uma meta-análise e revelaram que aproximadamente um quarto dos casos de carcinoma da mama foi afetado pela infecção pelo HPV, dos quais 32,42% ocorreram na Ásia e 12,91% na Europa. Na Síria, foi observada uma maior incidência de HPV no câncer de mama, 61,06% das amostras foram positivas (Akil *et al.*, 2008). Na Austrália, dois trabalhos que buscavam compreender a associação do HPV e o câncer de mama descreveram a prevalência do vírus em 50% dos carcinomas (Glenn *et al.*, 2012; Antonsson *et al.*, 2011).

Na América Latina, estudos também mostraram a presença do HPV em amostras com câncer de mama, com resultados bastante significativos: 29,4% no

México (de León *et al.*, 2009), 26% na Argentina (Suarez *et al.*, 2013), 8,7% no Chile (Aguayo *et al.*, 2011) e 25% no Brasil (Damin *et al.*, 2004).

Com relação à detecção do DNA de HPV em tecido benigno (não-câncer), estudo realizado por Tsai *et al.* (2005) relataram a presença de HPV em 6,3% das amostras com fibroadenomas mamário.

Apresença do DNA de HPV em casos de mama benigno ainda muito controverso, e outros estudos precisam ser realizados para avaliar se a infecção por HPV no tecido normal é ou não uma condição necessária para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Além disso, faz-se necessário avaliar se o DNA do HPV pode atingir o tecido mamário normal, a partir do extravasamento do tecido neoplásico, aos ductos e lóbulos adjacentes. Apesar disso, Li *et al.* (2015), por exemplo, avaliaram tecido normal da mama adjacente ao tumor e não detectaram o DNA viral. A presença do HPV também não está elucidada nos carcinomas mamários, alguns trabalhos descritos na Suíça (Lindel *et al.*, 2007) e Índia (Hedau *et al.*, 2011), não encontraram evidência de associação de HPV com carcinoma de mama.

Associando a presença do HPV à invasividade tumoral de câncer de mama, foi identificado no presente estudo que o tipo invasivo em carcinomas HPV-positivos foi predominante em 47,1% (49/104) das amostras, e menor nos carcinomas *in situ* (não-invasivo) 33,3% (1/3) das amostras.

Quanto a associação entre a histopatologia do tumor e a presença do DNA de HPV, foi observado que o tipo ductal foi o mais prevalente com 46% (46/100) dos carcinomas. Seguido pelos tipos mucinoso 100% (3/3), um tipo raro de câncer de mama, e o micropapilar com 100% (1/1) dos casos analisados. Na Austrália,

também foi observado a presença do HPV em carcinoma ductal invasivo frequente em 23% das amostras (Heng *et al.*, 2009).

Informações clínico-patológicas provenientes das entrevistas aplicadas as pacientes antes do procedimento de *corebiopsy*, realizada apenas nas amostras frescas, permitiram a comparação entre a presença do HPV com o histórico familiar. No entanto não houve associação entre a presença do DNA viral e a carcinogênese mamária. Na comparação entre a presença do HPV e pacientes em menopausa, utilização de anticoncepcionais e realização de exame de rastreio (mamografia) a frequência do DNA viral foi de 37% (10/14), 30,8% (4/14) e 29,4% (5/14) dos casos respectivamente. Esse é o primeiro estudo que compara a presença do HPV e a realização de mamografia, menopausa e uso de anticoncepcional.

A expressão dos receptores hormonais, estrógeno (ER) e progesterona (PR), bem como a superexpressão ou a amplificação de HER2, são indicadores importantes para pacientes com câncer da mama. Estes marcadores são comumente usados para definir o tratamento e estabelecer o prognóstico da doença (Fernandes *et al.*, 2015). No presente estudo, foi analisado uma possível associação entre o cancer de mama HPV-positivo com esses receptores. Nas amostras parafinadas avaliadas, foi verificado que 62,9% (22/35) das pacientes que expressaram ER e PR também continham o DNA viral. Ohba *et al.* (2014) demonstraram que em células tumorais da mama, o receptor de estrógeno está significativamente associado com a infecção pelo HR-HPV. Estes achados sugerem que o estrógeno pode atuar diretamente na transcrição de E6 / E7 do HPV no câncer de mama, ou, o HPV pode ter como alvo inicial células ER-positivo, culminando em um câncer de mama precoce. Assim, existem sinais de

uma relação entre estrógeno e E6 / E7 de HR-HPV nos estágios iniciais do câncer de mama (Yasmeen *et al.*, 2007).

Quanto ao receptor HER-2, 75% (3/4) das pacientes positivas para esse receptor estavam associadas a presença do HPV. Kroupis *et al.* (2006) descreveram um único trabalho que associa a presença do DNA de HPV de alto risco com parâmetros moleculares do câncer de mama, receptor do estrógeno, progesterona e HER-2. Alguns estudos têm mostrado que há uma forte relação entre as oncoproteínas virais de HR-HPV e HER-2, e que pacientes com esta associação portariam um fenótipo mais agressivo de câncer de mama (Al Moustafa *et al.*, 2004, Yasmeen *et al.*, 2007).

Entre os genótipos identificados em nosso estudo o HPV16, considerado de alto risco, foi o tipo mais frequente em nossas amostras, tanto nos tumores malignos de mama quanto no grupo controle (não-câncer). Um estudo desenvolvido no Sudeste do Brasil avaliando lesões cervicais identificou que 75% das mulheres foram infectados por genótipos de alto risco, sendo o HPV16 em 22,7% de todos os casos HPV positivo, seguido de HPV31 em 4,5%, (Boldrini *et al.*, 2014). Provavelmente, a alta prevalência desses tipos de HPV em lesões cervicais justifiquem a presença desses genótipos em nossas amostras de mama.

A distribuição dos genótipos de HPV está em conformidade com estudos anteriores realizado no México, em que o HPV16 foi o tipo mais comum detectado entre carcinoma de mama (de León *et al.*, 2009; Herrera-Goepfert *et al.*, 2013). Em trabalho realizado no Sul do Brasil, Damin *et al.* (2004), detectaram DNA de HPV em 25% dos carcinomas de mama com o tipo mais prevalente, sendo o HPV16, seguido pelo HPV18. No Irã, genótipos de HPV de alto risco em pacientes com câncer de mama foram os tipos predominantes, mas outros genótipos

(HPV6, HPV11, HPV15, HPV23 e HPV124) foram também detectados (Sigaroodi, *et al.*, 2012). Na Grécia, a maioria (67%) dos tipos de HPV identificados foram HPV16, seguido pelo HPV59 e 58 (Kroupis *et al.*, 2006). Nos trabalhos desenvolvidos por Antonsson (2011) e Glenn (2012), na Austrália, foi observado que o HPV18 foi único tipo encontrado nas neoplasias mamárias. Na Argentina, amostras frescas de carcinoma mamário apresentaram positividade para HPV11, sendo o genótipo mais prevalente, considerado de baixo risco, seguida por HPV16 de alto risco (Suarez *et al.*, 2013). Provavelmente, essas diferenças entre os genótipos de HPV encontrados nos diversos carcinomas de mama, seja explicada pela prevalência desses tipos na região cervical nos diferentes países.

A presença do genoma do HPV não é uma condição suficiente para estabelecer uma relação causal. Por esta razão, foi realizado um estudo de associação entre presença do HPV e a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7, e também dos supressores de tumor p53 e p16^{INK4A} em carcinomas de mama parafinados HPV-positivos. Os resultados do presente estudo mostram que a presença da oncoproteína E6 foi claramente expressa em 10,5% (4/4) das amostras benignas (não-câncer) e 89,5% (34/36) das amostras com câncer de mama, ambas com marcação predominante no citoplasma. Já a proteína E7 de HPV foi expressa em 10% (4/4) dos casos com alteração benigna e em 90% (36/36) dos casos com neoplasia mamária maligna, ambos os casos obtiveram marcação tanto nuclear quanto citoplasmática. Estes achados são importantes na elucidação do papel do HPV na carcinogênese mamária, pois mostram que além da detecção do DNA viral, as oncoproteínas foram detectadas nesses tecidos. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Ngan *et al.* (2015), que

acompanharam pacientes com alterações benignas que posteriormente progrediram para o câncer de mama.

Nesse estudo foi identificada a proteína E7 de HPV, com marcação nuclear, em 72% (23/32) amostras benignas e em 62,5% (20/32) das amostras de câncer, dos mesmos pacientes avaliados anteriormente. Estes resultados sugerem que as oncoproteínas de HPV podem influenciar na progressão oncogênica no câncer da mama. Adicionalmente, Ohba *et al.* (2014) e Vieira *et al.* (2014) observaram que os oncogenes de HR-HPV exercem influência na fase precoce do câncer de mama, através da interação entre E6/E7 e a enzima APOBEC3B, que está relacionada à estabilidade genômica, aumentando o risco de desenvolver câncer de mama. Estes mecanismos diferem do mecanismo de HPV no câncer do colo do útero, que está intimamente relacionado às oncoproteínas E6 e E7 de HPV desregulando o ciclo celular, inibindo a apoptose, e estimulando a progressão do ciclo celular por ligação e inibição dos genes supressores de tumor p53 e pRb.

Paralelamente, foi realizada a avaliação da expressão de p53 e p16 no tecido mamário HPV-positivo. Nesse estudo, a taxa de pacientes HPV-positivos que expressaram p53 foi baixa, com apenas 4,3% (1/4) dos casos benignos, e alta 95,7% (22/22) dos carcinomas HPV-positivo. O mesmo foi observado na associação entre HPV e a proteína p16^{INK4A}. No entanto a imunomarcação foi predominantemente nuclear tanto nos carcinomas quanto no grupo controle (não-câncer). Contudo, a expressão desses supressores de tumor em tecido mamário HPV-positivo não foi estatisticamente significativo.

Embora a associação entre as oncoproteínas E6 e E7 e positividade para o DNA do HPV não tenha um *p-value* significativo nas amostras de mama

analisadas, foi observado que a expressão de E6 94,4% (34/36) e de E7 100% (36/36) foi maior quando comparada a p53 61,1% (22/36) e p16^{INK4a} 33,3% (12/36). Uma possível explicação seria o mecanismo que envolve as oncoproteínas dos HR-HPV com p53 e p16. E6 interage com a proteína supressora tumoral p53. E6 quando associado a p53 induz a degradação desse supressor tumoral (Zur Hausen, 2009b). Além disso, E7 HR-HPV liga-se à proteína pRb liberando o fator E2F e superexpressando p16^{INK4a} por um mecanismo de *feedback* negativo. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar essa possível rota de interação entre o HPV e o câncer de mama.

Alguns autores consideram a carga viral um fator preditivo para persistência e gravidade de lesão em amostra cervical. Com base nisso, foi determinada a carga viral e o *status* de físico em nosso estudo nos casos HPV-positivos em tecido mamário. Um dos cenários possíveis é que o DNA viral está presente no início da alteração do tecido, de forma semelhante como a carcinogênese cervical, sendo possível o HPV ser encontrado em algumas amostras de tecido normal. Com base nisso, também foi avaliado no presente estudo a carga viral e o status físico em tecido mamário HPV-positivo com alterações benignas.

Foram avaliados por qPCR 14 amostras de carcinomas de mama, HPV-positivos, e 10 de amostras de tecido mamário benigno HPV-positivos. Como controle, foram utilizados SiHa e CaSki, duas linhagens celular de carcinoma cervical, ambas positiva para HPV16, levando em conta a ploidia. SiHa contem uma cópia do genoma do HPV, enquanto CaSki possui aproximadamente 500 cópias (Roberts *et al.*, 2008). A carga viral foi determinada pela quantidade de E6 de HPV16 em 10^4 célula. A média do número de cópias foi praticamente à mesma

quando comparado pacientes com câncer de pacientes não-câncer, sendo de 14,2 em carcinomas de mama e 14,4 em tecido mamário benigno. Era esperado que a carga viral do HPV em carcinomas da mama fosse muito menor do que a encontrada em tumores cervicais, justamente por não ser o sítio de origem da infecção, levando a diminuída concentração do DNA viral. Neste sentido, Aguayo *et al.* (2011) detectaram uma carga viral menor que a identificada no presente estudo. O número de cópias de HPV16 determinado por qPCR foi extremamente baixo em 1/4 dos casos estudados (0,14 cópias / célula). Em outros três casos, a carga viral foi maior (1,2; 2,0 e 33,8 cópias / célula). Um outro estudo, realizado no México, também identificou baixa carga viral, com média geométrica de 0,0021, e um caso com carga viral relativamente elevada de 0,263 (Herrera-Goepfert *et al.*, 2011).

Posteriormente as quantificações de E6 para detectar a carga viral, foram realizadas as quantificações de E2 por qPCR, visando avaliar o *status* físico do genoma viral. A perda de E2 é um indicativo que o DNA de HPV está integrado ao genoma do hospedeiro. Na presença de E2 foi avaliada a proporção entre E2/E6 para diferenciar a forma episomal e mista. No carcinoma de mama, E2 foi detectado em 42.9% (6/14) dos casos, já em tecido mamário benigno, E2 foi detectado em 50% (5/10) das pacientes. Com base nisso, a forma integrada foi predominante tanto em tecido com câncer quanto não-câncer.

Sabe-se que um genoma de HPV por célula é suficiente para transformação neoplásica como ocorrem em células SiHa onde há 1-2 cópias de HPV16 por célula (Aguayo *et al.*, 2011). Entretanto, alguns autores acreditam que a baixa carga viral seja um empecilho para associar o HPV a carcinogênese mamária.

Herrera-Goepfert *et al.* (2011), corroborando com nosso estudo, também detectou DNA de HPV16 integrado ao genoma do hospedeiro, mas não encontrou o DNA do HPV em espécimes de mamoplastia ou condições benignas da mama e tumores como doença fibrocística e fibroadenomas, bem como em tumor filóide.

Os HR-HPVs estão frequentemente integrados nas lesões de alto grau e em neoplasia intraepitelial cervical, enquanto os LR-HPVs geralmente estão presentes na forma episomal em lesões de baixo grau ou benignas (Hudelist *et al.*, 2004).

Embora o presente estudo tenha mostrado a presença do DNA de HPV em carcinoma mamário, visto que as oncogenes de HPV estavam sendo expressas nesse tecido e que na maioria dos casos o DNA viral estava integrado ao genoma do hospedeiro, não se pode afirmar que apenas as oncoproteínas de HPV sejam suficientes para transformação completa do tecido mamário no câncer de mama. No entanto, este trabalho demonstra passos importantes na elucidação do papel do HPV no câncer de mama, mas que necessitam de estudos complementares para estabelecer uma relação causal.

7. Conclusões

1. Pela primeira vez no nordeste do Brasil foi detectado o DNA de HPV em carcinoma mamário. A taxa de detecção encontrada em nosso estudo foi 46,7% nos tumores malignos de mama;
2. O presente estudo aponta que os tipos de HPV mais frequentes nos tumores malignos de mama, na população estudada, são HPV6, 16, 18, 31 e 58, sendo o HPV16 responsável por 92% dos casos de câncer de mama HPV-positivos;
3. Foi identificada uma média de 14,4 cópias do DNA do HPV em tecido benigno e 14,2 cópias do DNA do HPV em tumores malignos de mama;
4. O *status* físico predominante nas amostras analisadas foi a forma integrada, presente em 57,2% dos carcinomas de mama e em 50% dos tecidos benignos HPV-positivos, sugerindo que o HPV pode estar envolvido na carcinogênese mamária.
5. A presença das oncoproteínas E6 (HPV16) e E7 (HPV 16 e 18) e as proteínas supressores de tumor também foram detectadas nas neoplasias mamárias HPV-positivas. A detecção de p53 e p16^{INK4A} nos carcinomas de mama HPV-positivos foi de 95,7% e 92,3% respectivamente. E6 foi identificada em 89,5% dos tumores malignos de mama HPV-positivas, já é E7 foi detectada em 90% das neoplasias malignas estudadas, sugerindo atividade viral nesses carcinomas.

8. Referências Bibliográficas

- Aceto GM. et al. (2010) High-risk human papilloma virus infection, tumor pathophenotypes, and BRCA1/2 and TP53 status in juvenile breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 122, 671–683.
- Aguayo F. et al. (2007) Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. *Br. J. Cancer*, 97, 85–91.
- Aguayo F. et al. (2011) Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from Chile. *Infect. Agent. Cancer*, 6, 7.
- Akil N. et al. (2008) High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *Br. J. Cancer*, 99, 404–407.
- Al Moustafa A-E. et al. (2004) E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. *Oncogene*, 23, 350–358.
- Al Moustafa A-E. et al. (2004) E6/E7 proteins of HPV type 16 and ErbB-2 cooperate to induce neoplastic transformation of primary normal oral epithelial cells. *Oncogene*, 23, 350–358.
- Ali SHM. et al. (2014) Detection and genotyping of human papillomavirus in breast cancer tissues from Iraqi patients. *East. Mediterr. Health J. Rev. Santé Méditerranée Orient. Al-Majallah Al-Şihhiyah Li-Sharq Al-Mutawassiṭ*, 20, 372–377.
- Allred DC. et al. (2004) The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 6, 240.
- Amarante MK and Watanabe MAE. (2009). The possible involvement of virus in breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(3), 329–37. <http://doi.org/10.1007/s00432-008-0511-2>
- Amarante MK. et al. (2009) The possible involvement of virus in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 135, 329–337.
- Antonsson A. et al. (2011) High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. *J. Med. Virol.*, 83, 2157–2163.
- Arpino G. et al. (2004) Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.*, 6, R149–R156.
- Baldez Da Silva MF, Chagas BS, Guimaraes V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL et al. (2009) HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res* 8(4):1437-1443.
- Balko, J. M., Stricker, T. P., & Arteaga, C. L. (2013). The genomic map of breast cancer: which roads lead to better targeted therapies? *Breast Cancer Research : BCR*, 15(4), 209. doi:10.1186/bcr3435
- Baltzell K. et al. (2012) Limited evidence of human papillomavirus in [corrected] breast tissue using molecular in situ methods. *Cancer*, 118, 1212–1220.
- Band . et al. (1990) Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 87, 463–467.
- Bell DW. (2010) Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J. Pathol.*, 220, 231–243.

- Bellanger S, Tan CL, Xue YZ, Teissier S, and Thierry F. (2011). Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *American Journal of Cancer Research*, 1(3), 373–389.
- Bergvall M, Melendy T, and Archambault J. (2013). The E1 proteins. *Virology*, 445(1-2), 35–56. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.020>
- Bernard H-U. et al. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 70–79.
- Bertram JS. (2000) The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.*, 21, 167–223.
- Bhargava R. et al. (2010) Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases. *Cancer*, 116, 1431–1439.
- Bianchini G. et al. (2014) The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol.*, 15, e58–68.
- Boldrini, N. T., Freitas, L. B., Coutinho, A. R., Loureiro, F. Z., Spano, L. C., & Miranda, A. E. (2014). High-grade cervical lesions among women attending a reference clinic in Brazil: associated factors and comparison among screening methods. *PloS One*, 9(7), e102169. doi:10.1371/journal.pone.0102169
- Brattbauer, G.L. et al. (1992) Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18. *Pathol. Res. Pract.*, 188, 384–386.
- Burk RD. et al. (2013) Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445, 232–243.
- Campa D. et al. (2015). Genetic risk variants associated with in situ breast cancer. *Breast Cancer Research*, 17(1), 82. <http://doi.org/10.1186/s13058-015-0596-x>.
- Cancer TIA. for R. on (2003) Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 1 edition. World Health Organization.
- Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. (2000). Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*; 6:4171–5.
- Carcopino X, Henry M, Benmoura D, Fallabregues AS, Richet H, L Boubli, Tamalet C. (2006). Determination of HPV type 16 and 18 viral load in cervical smears of women referred to colposcopy. *J Med Virol* 78: 1131 -1140.
- Cescon DW, Haibe-Kains B, and Mak TW. (2015). APOBEC3B expression in breast cancer reflects cellular proliferation, while a deletion polymorphism is associated with immune activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(9), 2841–2846. <http://doi.org/10.1073/pnas.1424869112>
- Cheang MCU. et al. (2006) Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 24, 5637–5644.
- Cheang MCU. et al. (2009) Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 101, 736–750.
- Choi Y-L. et al. (2007) Detection of human papillomavirus DNA by DNA chip in breast carcinomas of Korean women. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, 28, 327–332.
- Chung S-H, Wiedmeyer K, Shai A, Korach KS, and Lambert PF. (2008). Requirement for estrogen receptor alpha in a mouse model for human

- papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research*, 68(23), 9928–34. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2051>
- Clemons M and Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. (2001). *N Engl J Med* 344:276-285.
- Contractor KB. et al. (2008) Male breast cancer: is the scenario changing. *World J. Surg. Oncol.*, 6, 58.
- Czerwenka, K. et al. (1996) Human papilloma virus DNA: a factor in the pathogenesis of mammary Paget's disease? *Breast Cancer Res. Treat.*, 41, 51–57.
- Damin, A.P.S. et al. (2004) Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*, 84, 131–137.
- de Cremoux P. et al. (2008) No evidence of human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.*, 109, 55–58.
- de León DC et al. (2009) Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. *BMC Cancer*, 9, 26.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, and Snijders PJ (1995) The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76(4):1057-1062.
- de Villiers E-M. et al. (2005) Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.*, 7, R1–R11.
- Di Lonardo, A. et al. (1992) Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 21, 95–100.
- Doorbar J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525–541. <http://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Doorbar J. et al. (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55–70.
- Doorbar J. (2005) The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.*, 32, 7–15.
- Duarte J, Bustamante M, Dinizza R, et al. (2011). Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras.*;58(2):178–187. doi: 10.1016/S0104-4230(12)70178-1.
- Elbel M. et al. (1997) A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology*, 239, 132–149.
- Fan S. et al. (1999) BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science*, 284, 1354–1356.
- Fasano J. et al. (2009) Breast cancer arising in a BRCA-mutated background: therapeutic implications from an animal model and drug development. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, 20, 609–614.
- Fernandes JV, Araújo JMG, and Fernandes TAA de M. (2013a). Biology and natural history of human papillomavirus infection. *Journal of Clinical Trials*, 1–12.
- Fernandes, J., Carvalho, M., de Fernandes, T., Araújo, J., Azevedo, P., Azevedo, J., & Meissner, R. (2013). Prevalence of Human Papillomavirus Type 58 in Women With or Without Cervical Lesions in Northeast Brazil. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 3(4), 504–510. <http://doi.org/10.4103/2141-9248.122060>

- Fimereli D. et al. (2015) No significant viral transcription detected in whole breast cancer transcriptomes. *BMC Cancer*, 15, 147.
- Francis IM, Al-Ayadhy B, Al-Awadhi S, Kapila K, and Al-Mulla F. (2013). Prevalence and Correlation of Human Papilloma Virus and its Types with Prognostic Markers in Patients with Invasive Ductal Carcinoma of the Breast in Kuwait, 13(November), 527–533.
- Fu L. et al. (2015) Association of human papillomavirus type 58 with breast cancer in Shaanxi province of China. *J. Med. Virol.*, 87, 1034–1040.
- Fuqua S. (2001). The role estrogen receptor in breast cancer metastasis. *J Mam Gland Neopl* 6:407-417.
- Ganguly N, and Parihar SP. (2009). Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of Biosciences*, 34(1), 113–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19430123>.
- Gasco M, Shami S, and Crook, T. (2002). The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 4(2), 70–76. <http://doi.org/10.1186/bcr426>.
- Gopalkrishna, V. et al. (1996) Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction. *Breast Cancer Res. Treat.*, 39, 197–202.
- Gumus M. et al. (2006) HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients' normal and tumoral tissue samples. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, 25, 515–521.
- Gurgel, APAD, Chagas, BS, do Amaral, CM, Nascimento, KCG, Leal, LRS, Silva Neto, J. da C., ... de Freitas, AC (2015). Prevalência de Papilomavírus Humano variantes e da diversidade genética no gene L1 e Long Controle Região de HPV16, HPV31 e HPV58 Encontrado em Nordeste do Brasil. *BioMed Research International*, 2015, 130828. <http://doi.org/10.1155/2015/130828>
- Hachana, M. et al. (2010) No evidence of human papillomavirus DNA in breast carcinoma in Tunisian patients. *Breast Edinb. Scotl.*, 19, 541–544.
- Hamid NA, Brown C, Gaston K. (2009). A regulação da proliferação celular pelas proteínas precoces de papilomavírus. *Cell Mol Life Sci*, 66:. 1700-1717.
- Hammond MEH. et al. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 134, e48–72.
- He Q. et al. (2008) The correlations between HPV16 infection and expressions of c-erbB-2 and bcl-2 in breast carcinoma. *Mol. Biol. Rep.*, 36, 807–812.
- Hedau S. et al. (2011) Breast cancer and human papillomavirus infection: No evidence of HPV etiology of breast cancer in Indian women. *BMC Cancer*, 11, 27.
- Heng B. et al. (2009) Human papilloma virus is associated with breast cancer. *Br. J. Cancer*, 101, 1345–1350.
- Hennig EM. et al. (1999) Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res. Treat.*, 53, 121–135.
- Hernández JEL et al. (2014) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Medellín, Colombia. *Hered. Cancer Clin. Pract.*, 12, 11.

- Herrera-Goepfert R. et al. (2013) High-risk human papillomavirus (HPV) DNA sequences in metaplastic breast carcinomas of Mexican women. *BMC Cancer*, 13, 445.
- Herrera-Goepfert, R., Khan, N. a, Koriyama, C., Akiba, S., & Pérez-Sánchez, V. M. (2011). 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)*, 20(2), 184–9. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2010.11.006>
- Hilakivi-Clarke, L. (2000) Estrogens, BRCA1, and Breast Cancer. *Cancer Res.*, 60, 4993–5001.
- Hindmarsh PL, and Laimins LA. (2007). Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid proteins and pseudovirion entry. *Virology Journal*, 12, 1–12. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-4-19>
- Hondermarck, H. et al. (2008) Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. *J. Proteome Res.*, 7, 1403–1411.
- Horvath CAJ, Boulet GAV, Renoux VM, Delvenne PO, and Bogers J-PJ. (2010). Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology Journal*, 7, 11. <http://doi.org/10.1186/1743-422X-7-11>
- Hosseini R. et al. (2013) Prevalence of human papillomavirus genotypes associated with cervical and breast cancers in Iran. *Monoclon. Antibodies Immunodiagn. Immunother.*, 32, 399–403
- Hsu C.-R. et al. (2010) Possible DNA Viral Factors of Human Breast Cancer. *Cancers*, 2, 498–512.
- Hudelist, Gernot et al. (2004). Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecologic Oncology*, Volume 92, Issue 3, 873 - 880.
- Hunter KW, Crawford NP, and Alsarraj J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research*, 10. <http://doi.org/10.1186/bcr1988>
- Ignatoski KMW, Dziubinski ML, Ammerman C, and Ethier SP. (2005). Cooperative Interactions of HER-2, HPV-16 Oncoproteins in the Malignant Transformation of Human Mammary Epithelial Cells. *Neoplasia*, 7(8), 788–798. <http://doi.org/10.1593/neo.05106>
- INCA. Estimativa 2016/2017. (2015) Disponível em [\[http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp\]](http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp). Acessado em 19 de janeiro de 2016.
- Iqbal N and Iqbal N. (2014). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International*, 2014, 852748. <http://doi.org/10.1155/2014/852748>
- Joshi D and Buehring GC. (2012). Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. *Breast Cancer Research and Treatment*, 135(1), 1–15. <http://doi.org/10.1007/s10549-011-1921-4>
- Kan, C.-Y. et al. (2005) Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br. J. Cancer*, 93, 946–948.
- Kao J. et al. (2006) RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. *Genes. Chromosomes Cancer*, 45, 761–769.
- Khammapirad T. et al. (2011) Intraductal papilloma of the breast in association with preoncogenic gene of breast cancer. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 1, 161–163.

- Khan NA et al. (2008) Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br. J. Cancer*, 99, 408–414.
- Kroupis C. et al. (2006) Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin. Biochem.*, 39, 727–731.
- Kwong A. et al. (2013) No Evidence of Human Papillomavirus in Patients with Breast Cancer in Hong Kong, Southern China, No Evidence of Human Papillomavirus in Patients with Breast Cancer in Hong Kong, Southern China. *Int. Sch. Res. Not. Int. Sch. Res. Not.*, 2013, 2013, e546503.
- Larsen MJ et al. (2014) Hereditary Breast Cancer: Clinical, Pathological and Molecular Characteristics. *Breast Cancer Basic Clin. Res.*, 8, 145–155.
- Lehmann U. (2015) Lobular breast cancer - the most common special subtype or a most special common subtype? *Breast Cancer Res. BCR*, 17.
- Li J, Ding J, and Zhai K. (2015). Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. *Plos One*, 10(8), e0136050. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136050>
- Li N, Bi X, Zhang Y, Zhao P, Zheng T, and Dai M. (2011). Human papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, 126(2), 515–20. <http://doi.org/10.1007/s10549-010-1128-0>
- Li J, Ding J, and Zhai K. (2015). Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. *Plos One*, 10(8), e0136050. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0136050>
- Lindel K. et al. (2007) Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *Breast Edinb. Scotl.*, 16, 172–177.
- Lisanti MP. et al. (2013) Oncogenes induce the cancer-associated fibroblast phenotype: metabolic symbiosis and “fibroblast addiction” are new therapeutic targets for drug discovery. *Cell Cycle Georget. Tex*, 12, 2723–2732.
- Liu, Y. et al. (2001) Human papillomavirus DNA is present in a subset of unselected breast cancers. *J. Hum. Virol.*, 4, 329–334.
- Lloyd MC, Allam-Nandyala P, Purohit CN, Burke N, Coppla D, Bull MM. (2010). Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? *J Pathol Inform*; 1:29.
- Logan, G.J. et al. (2015). Molecular drivers of lobular carcinoma in situ. *Breast Cancer Res. BCR*, 17.
- Lopes FF et al. (2005). Análise imuno-histoquímica das citoqueratinas em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatóide. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol.41 no.6
- Manos M M, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM (1989) Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cells* 7(17):209-14.
- Mant C, Hodgson S, Hobday R, D'Arrigo C, and Cason J. (2004). A viral aetiology for breast cancer: time to re-examine the postulate. *Intervirology*, 47(1), 2–13. <http://doi.org/10.1159/000076636>
- Manzouri L. et al. (2014) Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005-2009 in Isfahan. *Adv. Biomed. Res.*, 3.
- McBride AA. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, 445(1-2), 57–79. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006>

- McLaughlin-Drubin ME. et al. (2009) Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res.*, 143, 195–208.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. (2001). Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol.*;82:15-33.
- Mendizabal-Ruiz AP et al. (2009) Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. *Breast Cancer Res. Treat.*, 114, 189–194.
- Moasser MM. (2007). The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45), 6469–6487. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>.
- Moody CA and Laimins LA. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews. Cancer*, 10(8), 550–60. <http://doi.org/10.1038/nrc2886>
- Münger K. et al. (2004) Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J. Virol.*, 78, 11451–11460.
- Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123:21-7.
- Ngan, C., Lawson, J. S., Clay, R., Delprado, W., Whitaker, N. J., & Glenn, W. K. (2015). Early Human Papilloma Virus (HPV) Oncogenic Influences in Breast Cancer, 93–97. <http://doi.org/10.4137/BCBCR.S35692>.
- Ohba K. et al. (2014) In Vivo and In Vitro Studies Suggest a Possible Involvement of HPV Infection in the Early Stage of Breast Carcinogenesis via APOBEC3B Induction. *PLoS ONE*, 9, e97787.
- Paavonen J. (2007). Human papillomavirus infection and the development of cervical cancer and related neoplasias. *Int. J. Infect. Dis.*, 11 Suppl 2, S3–9.
- Pao CC, Lin SS, Lin CY, Maa JS, Lai CH, Hsieh TT. (1991). Identification of human papillomavirus DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Pathol*, 95:540–546.
- Pare, R. et al. (2013) Breast cancer precursors: diagnostic issues and current understanding on their pathogenesis. *Pathology (Phila.)*, 45, 209–213.
- Paredes J. et al. (2007) P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.*, 450, 73–80.
- Pedroso PMO. (2008). Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. *Pesq. Vet. Bras.* 28(12):627-632.
- Peitsaro, P., Johansson, B., & Syrjänen, S. (2002). Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. *J Clin Microbiol Mar*;40(3):886-91.
- Polyak, K. (2007) Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.*, 117, 3155–3163.
- Pornthanakasem W, Shotelersuk K, Termrungruanglert W, Voravud N, Niruthisard S, Mutirangura A. (2001). Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. *BMC Cancer*;1:2.
- Pujol P. et al. (2004) Les formes héréditaires de cancer du sein liées à BRCA1 et BRCA2 sont-elles sensibles aux œstrogènes ? *Bull. Cancer (Paris)*, 91, 583–591.
- Rakha EA. et al. (2007) Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res. BCR*, 9, 404; author reply 405.

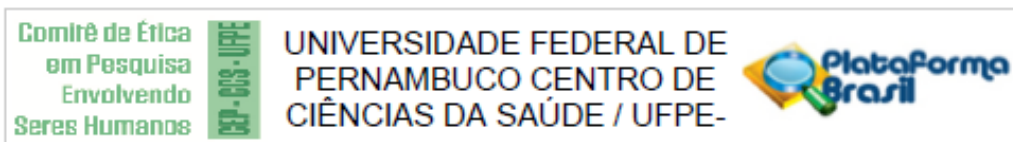
- Rassi H. et al. (2014) Retraction: Relation between HPV genotypes and BRCA mutation in familial breast cancer. *J. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.4014/jmb.1407.07011.
- Roberts I, Ng G, Foster N, Stanley M, Herdman MT, Pett MR, Teschendorff A and Coleman N. Critical evaluation of HPV16 gene copy number quantification by SYBR green PCR. (2008). *BMC Biotechnology* 8:57 DOI: 10.1186/1472-6750-8-57
- Roman A, and Munger K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 445(1-2), 138–168. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>
- Rosen EM. et al. (2005) BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr. Relat. Cancer*, 12, 533–548.
- Russo J, Russo IH. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:89-96.
- Salles MA, Cúrcio VS, Perez AA, Gomes DS, Gobbi H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol Med Lab.* 2009;45(3):213-22.
- Sandhu R, Parker J, Jones W, et al. (2010). Microarray-based gene expression profiling for molecular classification of breast cancer and identification of new targets for therapy. *Lab Med.*; 41 (6): 364-372.
- Shachaf CM. et al. (2005) Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. *Trends Mol. Med.*, 11, 316–321.
- Shai A, Pitot HC, and Lambert PF. (2008). p53 Loss Synergizes with Estrogen and Papillomaviral Oncogenes to Induce Cervical and Breast Cancers. *Cancer Research*, 68(8), 2622–2631. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5266.p53>
- Shukla S. et al. (2009) Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J. Med. Res.*, 130, 222–233.
- Sigaroodi A. et al. (2012) 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. *Sci. World J. Sci. World J.*, 2012, 2012, e837191.
- Simões PW, Medeiros LR, Pires PDS, Edelweiss MI, Rosa DD, Silva FR, Rosa MI. et al. (2012). Prevalence of Human Papillomavirus in Breast Cancer A Systematic Review. *Int J Gynecol Cancer*, 22(3), 343–347. <http://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31823c712e>
- Sommer S and Fuqua Sa. (2001). Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 11:339-352.
- Stanley MA. et al. (2007) HPV: from infection to cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 1456–1460.
- Störmer M, Vollmer T, Henrich B, Kleesiek K, Dreier J. (2009). Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *Int J Med Microbiol.* Apr;299(4):291-300. doi: 10.1016/j.ijmm.2008.08.002.
- Suarez ALP. et al. (2013) Presence of Human Papilloma Virus in a Series of Breast Carcinoma from Argentina. *PLoS ONE*, 8, e61613.
- Syrjanen KJ. (2002). HPV infections and lung cancer. *J Clin Pathol*; 55: 885-91.
- Tábor, N., Ferrera, A., Bakkers, J. M. J. E., Massuger, L. F. A. G., & Melchers, W. J. G. (2008). High HPV 16 viral load is associated with increased cervical

- dysplasia in Honduran women. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(5), 843–846.
- Tikk K, Sookthai D, Fortner RT, Johnson T, Rinaldi S, Romieu I, et al. (2015). Circulating prolactin and in situ breast cancer risk in the European EPIC cohort: a case-control study. *Breast Cancer Research: BCR*, 17(1), 49. <http://doi.org/10.1186/s13058-015-0563-6>.
- Tsai J.-H, Tsai C-H, Cheng M-H, Lin S-J, Xu, F-L and Yang C-C. (2005). Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J. Med. Virol.*, 75: 276–281. doi: 10.1002/jmv.20267
- Tsai, J.-H., Tsai, C.-H., Cheng, M.-H., Lin, S.-J., Xu, F.-L. and Yang, C.-C. (2005). Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J. Med. Virol.*, 75: 276–281. doi: 10.1002/jmv.20267
- Vargo-Gogola T. et al. (2007) Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat. Rev. Cancer*, 7, 659–672.
- Venuti A. et al. (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer*, 10, 140.
- Vergote I, Neven P, Van Dam P, Serreyn R, De Prins F, De Sutter P, Albertyn G. (2000). The oestrogen receptor and its selective modulators in gynaecological and breast cancer. *Eur J Cancer* 36:S1-9.
- Vieira VC. et al. (2014). Human Papillomavirus E6 Triggers Upregulation of the Antiviral and Cancer Genomic DNA Deaminase APOBEC3B. *mBio*, 5(6), e02234–14. <http://doi.org/10.1128/mBio.02234-14>
- Wang T. et al. (2014) Detection and Analysis of Human Papillomavirus (HPV) DNA in Breast Cancer Patients by an Effective Method of HPV Capture. *PLoS ONE*, 9, e90343.
- Wang XZ, Liu Q, Sun JJ, Zuo WS, Hu DW, Mu DB, and Yu ZY. (2015). Correlation between p53 and epidermal growth factor receptor expression in breast cancer classification, 14(2), 4282–4290.
- WHO/GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. (2014).
- Widschwendter A. et al. (2004) Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.*, 31, 292–297.
- Widschwendter, A. et al. (2004) Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.*, 31, 292–297.
- Wiwanitkit, V. (2006) Interaction between BRCA1 and human papilloma virus E7: an ontology study. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 274, 146–149.
- Wolff AC. et al. (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 131, 18–43.
- Wood LD. et al. (2007) The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318, 1108–1113.
- Yamashita H. (2015). Tumor biology in estrogen receptor-positive, human epidermal growth factor receptor type 2-negative breast cancer: Mind the menopausal status. *World Journal of Clinical Oncology*, 6(6), 220. <http://doi.org/10.5306/wjco.v6.i6.220>

- Yasmeen A. et al. (2007) E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Cell Cycle Georget. Tex*, 6, 2038–2042.
- Yiannakopoulou E. (2014) Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. *Cell. Oncol. Dordr.*, 37, 1–8.
- Yoshida N, Omoto Y, Inoue A, Eguchi H, Kobayashi Y, Kurosumi M, Saji S, Suemasu K, Okazaki T, Nakachi K, Fujita T, Hayashi S. (2004). Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Sci* 95:496-502.
- Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. (1999). HPV 33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res.*;19:5057– 5061.
- Yu, Y. et al. (1999) HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res.*, 19, 5057–5061.
- Yu, Y. et al. (2000) Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer Tokyo Jpn.*, 7, 33–36.
- Zhang Y. et al. (2005) BRCA1 interaction with human papillomavirus oncoproteins. *J. Biol. Chem.*, 280, 33165–33177.
- Zur Hausen H. (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1288, F55–78.
- Zur Hausen H. (1999) Papillomaviruses in Human Cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians*, 111, 581–587.
- Zur Hausen H. (2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92, 690–698.
- Zur Hausen H. (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 342–350.
- Zur Hausen H. (2009) (b). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384, 260–265.
- Zur Hausen H. (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384, 260–265.
- Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why. *Virology*. 2009; 392 :1–10.

9. Anexos

9.1 Anexo 1 - Parecer Consubstanciado



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA PATOGÊNESE MAMÁRIA, SUA ASSOCIAÇÃO COM O HPV E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS POTENCIAIS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DAS LESÕES

Pesquisador: Jacinto da Costa Silva Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28508614.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 645.585

Data da Relatoria: 19/05/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

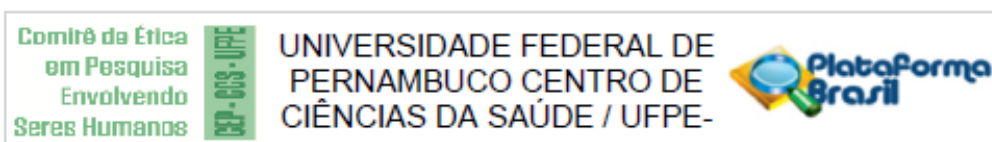
Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

S/recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.



Continuação do Parecer: 645.585

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação " e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado .

RECIFE, 13 de Maio de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
 (Coordenador)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS.

Pesquisador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06586612.9.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Declaração de confidencialidade

Justificativa: Solicito que desconsidere o documento anteriormente enviado ao CEP, já que o

Data do Envio: 03/02/2013

Situação da Notificação: Aguardando revisão do parecer do colegiado

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 196.577

Data da Relatoria: 14/02/2013

Apresentação da Notificação:

A notificação foi apresentada para confirmar o documento de confidencialidade devidamente assinado pelo pesquisador.

Objetivo da Notificação:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Indicado na relatoria inicial.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Documento assinado aceito e aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL ou por meio de ofício impresso emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 14 de Fevereiro de 2013

Assinador por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

9.2 Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre Esclarecido



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (MAIORES DE 18 ANOS)

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS, que está sob a responsabilidade e orientação do pesquisador Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, pesquisador do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, localizado na Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Cidade Universitária, Recife-PE CEP: 50.670-901/Tel. 2126-8484 E-mail: ebeltrao@hotmail.com. Também participam dessa pesquisa os pesquisadores: Juliana Vasconcelos (e-mail: juli6296@yahoo.com.br/ Fone: (81) 87689282), Steffany Ferreira (steffany.ferreira@gmail.com/ Fone: (81)86663668), Luiza Lima (luizarayanna@gmail.com/ Fone: (81) 98313976), Bruno Trajano (brunotrajano@hotmmail.com/Fone:(81) 99813928), Juliana Brandão (juliana.mbrandao@ig.com.br/Fone: 91835554).

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

♦ Esta pesquisa consiste no estudo de biomarcadores moleculares associados ao câncer, visando à melhoria futura da qualidade de vida dos pacientes com câncer, através de novas propostas para diagnóstico e/ou prognóstico desta doença. A coleta do material para pesquisa se dará em duas coletas de sangue venoso (10mL), constando de uma coleta pré-cirúrgica e uma pós-cirúrgica. Também será realizada a coleta de fragmento do tumor, que ocorrerá durante o procedimento cirúrgico realizado por recomendação médica e que faça parte do seu tratamento. Será incluso um grupo controle de indivíduos saudáveis que irão se submeter a cirurgias plásticas e/ou reparadora, por recomendação médica. A coleta sanguínea e a captação da amostra cirúrgica serão realizadas respeitando todos os critérios de biossegurança vigentes e com profissionais habilitados. Para todos estes, será aplicando um questionário socioeconômico em ambiente privado, evitando assim qualquer tipo de constrangimento.

♦ Os riscos à saúde proporcionados aos participantes desta pesquisa são: no momento da coleta sanguínea você poderá sentir um leve mal-estar, principalmente em estado de jejum e por alteração emocional, também possível incômodo no momento da penetração da agulha utilizada para este procedimento, além disso, poderão aparecer manchas arrozeadas em seu braço após algumas horas da coleta sanguínea. Como risco a saúde psíquica, você poderá sentir constrangimento no momento da aplicação do questionário socioeconômico.

♦ Você como participante da pesquisa, terá como benefícios indiretos, beneficiar as suas novas gerações contribuindo para a busca de novos alvos para diagnóstico e tratamento do câncer, doença que hoje tem uma grande relação com a genética familiar. Deixamos claro que essa pesquisa não irá proporcionar benefício direto através da mudança nos procedimentos médicos adotados atualmente e não serão aplicados novos tipos de tratamento e testes diagnóstico nos pacientes e indivíduos envolvidos.

♦ O tempo de sua participação na pesquisa será durante o seu tratamento. Não haverá necessidade de visitas domiciliares e reuniões futuras. Todos os dados fornecidos através do questionário serão mantidos

em absoluto sigilo. Deixamos claro que você tem a liberdade de cancelar sua participação em qualquer estágio da pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo e/ou cobranças.

♦ Todos os dados coletados e os materiais biológicos (sangue e fragmentos cirúrgicos) serão armazenados no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), estando eles sob-responsabilidade do Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, no tempo mínimo de 5 anos.

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

Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

9.3 Anexo 3 - Questionário (Anamnese aplicada)

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES DE USO POTENCIAL NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE ALTERAÇÕES MAMÁRIAS E PROSTÁTICAS HUMANAS

Pesquisador responsável: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

QUESTIONÁRIO

Entrevistador _____ Data da entrevista ____/____/____

Nº IDENTIFICAÇÃO PACIENTE: _____

Local da entrevista: () enfermaria (leito) () durante espera para consulta

Setor de origem do paciente: _____

Entrevistado: Idade _____

Assinalar faixa de idade:

- () De 18-30 anos
- () 31-40 anos
- () 41-50 anos
- () 51-60 anos
- () 61-70 anos
- () 71-80 anos
- () acima de 80 anos

Qual seu peso corpóreo? _____

Qual sua altura? _____

PARTE I – PERFIL SÓCIO-ECONÔMICO

1- Grau de instrução:

- () Analfabeto
- 1º grau () completo; () incompleto
- 2º grau () completo; () incompleto
- 3º grau () completo; () incompleto

2- Qual a profissão? _____

3- Estado Civil:

- () Solteiro
- () Casado
- () Divorciado
- () Viúvo

4- Qual sua religião? _____

5- Quantas pessoas moram na mesma casa que você?

- ☐ De 1 a 3 pessoas
- ☐ De 3 a 5 pessoas
- ☐ Acima de 6 pessoas

6- Renda familiar:

- ☐ menor que 545 reais
- ☐ entre 545 e 1.100 reais
- ☐ entre 1.100 e 2.000 reais
- ☐ entre 2.000 e 3.000 reais
- ☐ acima de 3.000 reais

7- Raça:

- ☐ branca
- ☐ parda
- ☐ negro
- ☐ amarelo
- ☐ indígena

8- Residente em:

- ☐ Recife –PE
- ☐ Zona Metropolitana do Recife
- ☐ Interior do estado (Nome da cidade _____)
- ☐ Zona rural de outra cidade (Nome da cidade _____)
- ☐ Outro estado

9- Você tem plano de saúde:

- ☐ Sim
- ☐ Não

10- Utilizou o SUS durante todo o seu tratamento:

- ☐ sim
- ☐ Não

PARTE II - CONHECIMENTO SOBRE A DOENÇA

11 – Com quantos anos foi sua menarca (primeira menstruação)?

- ☐ 8-10 anos
- ☐ 11-12 anos
- ☐ 13-14 anos
- ☐ 15-17 anos
- ☐ maior que 18 anos

12- Número de gestações:

- ☐ 0
- ☐ 1-2
- ☐ 3-4
- ☐ 5-7
- ☐ 8-10
- ☐ 11 ou mais

13- Passou por quantos partos (paridade)?

- ☐ 1-2
- ☐ 3-4
- ☐ 5-7
- ☐ 8-10
- ☐ 11 ou mais

14- Passou por aborto?

- ☐ não
- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ acima de 3

15- Amamentou quantos filhos por período igual ou superior a 6 meses:

- ☐ 0
- ☐ 1-2
- ☐ 3-4
- ☐ 5-7
- ☐ acima de 7 filhos

16- Qual a idade da 1ª gestação?

- ☐ 12-14
- ☐ 15-17
- ☐ 18-24
- ☐ 25-27
- ☐ 28

17- Com quantos anos você entrou em menopausa?

- ☐ 40-45 anos
- ☐ 45-50 anos
- ☐ acima de 50 anos

18- Você realizava o auto-exame:

- ☐ não
- ☐ sim, sempre
- ☐ sim, raramente

19- Não realizava o auto-exame porque?

- ☐ Esquecimento
- ☐ Falta de interesse
- ☐ Não achava importante
- ☐ Não sabia como fazer

20- Fazia exames de rotina como mamografia?

- ☐ sim. Qual frequência? ☐ 6 em 6 meses; ☐ anual; ☐ 2 em dois anos ☐ acima de dois anos)
- ☐ não. Porquê? _____

21- Como descobriu a doença?

- () Pelo auto-exame
 () Por exame médico de rotina
 () Por mamografia
 () Ultrassonografia

22- Você sentia dor na mama?

- () sim, com frequência
 () raramente
 () não

23- Você percebeu excreção de algum líquido?

- () sim
 () não

24- Por quanto tempo você apresenta alguns destes sintomas acima citados?

- () de 1 a 4 semanas
 () de 1 a 6 meses
 () de 6 a 12 meses
 () de 1 a 2 anos meses
 () acima de dois anos

25 – Com quantos anos você identificou a doença?

- () abaixo de 30 anos
 () entre 31 e 40 anos
 () entre 41 e 50 anos
 () entre 51 e 60 anos
 () acima de 61 anos

26 – Sua mãe ou irmã (parente de primeiro grau) tem/teve câncer de mama?

- () Sim: () mãe e/ou () irmã
 () não

27 – Sua avó ou alguma tia (parente de segundo grau) tem/teve câncer de mama?

- () Sim: () avó e/ou () tia
 () não

28-21- Fez/Faz uso de anticoncepcionais orais ou injetáveis?

- () Não, nunca.
 () Sim, por _____ (anos, meses).

29- Você fuma:

- () sim
 () não
 () Ex-fumante (fumou durante _____ anos

30- Você faz uso de bebida alcoólica?

- () não
 () sim () 1-2 dias/semana 2-3 dias/semana () acima de 4 dias/semana

31- Prática de atividade física?

- ☐ sim
☐ não

32- Se praticava atividade física, qual a regularidade?

- ☐ uma vez por semana
☐ duas vezes por semana
☐ três vezes por semana
☐ todos os dias

33- Você tem hipertensão (pressão alta)?

- ☐ Sim
☐ Não

34- Você tem diabetes (glicose alta)?

- ☐ Sim
☐ Não

35- Qual a frequência de ingestão destes alimentos?

Frituras: ☐ três dias por semana ☐ 2 dias por semana ☐ Todos os dias da semana

Massas: ☐ três dias por semana ☐ 2 dias por semana ☐ Todos os dias da semana

Carne vermelha: ☐ três dias por semana ☐ 2 dias por semana ☐ Todos os dias da semana

Doces: ☐ três dias por semana ☐ 2 dias por semana ☐ Todos os dias da semana

Frutas: ☐ três dias por semana ☐ 2 dias por semana ☐ Todos os dias da semana

Legumes e saladas: ☐ três dias por semana ☐ 2 dias por semana ☐ Todos os dias da semana

36- Quais medicamentos que você faz uso e para que?

Observações relevantes feitas pelo pesquisador:

10. Curriculum vitae (Lattes)

Elyda Gonçalves de Lima

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Elyda Gonçalves de Lima
Filiação Ednaldo Gonçalves de Lima e Eliane Aparecida de Lima
Nascimento 02/01/1985 - Paulista/PE - Brasil
Carteira de Identidade 2662013 SSP - PB - 11/06/1999
CPF 048.859.764-13

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: AVALIAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE INFECÇÃO POR Papilomavírus humano E CÂNCER DE MAMA, Ano de obtenção: 2016
Orientador: Antonio Carlos de Freitas
Bolsista do(a): Reestruturação e Expansão das Universidades Federais
- 2008 - 2011** Mestrado em Inovação Terapêutica.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Imunização Genética para o controle de papilomavíroses: Construção de um vetor vacinal baseado no gene L2 do papilomavírus bovino tipo 1 e 2., Ano de obtenção: 2011
Orientador: Antônio Carlos de Freitas
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005** Graduação em Farmácia.
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
- 2003 - 2007** Graduação em Lic. e Bac. em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
Título: POTENCIALIDADES GENÉTICAS DE *Trichoderma* spp. NA PRODUÇÃO DE EXTRATOS E METABÓLITOS ANTAGÔNICOS A FITOPATÓGENOS
Orientador: José Farias da Mata

Formação complementar

- 2004 - 2005** Extensão universitária em Laboratório Itineranteda PROEAC. (Carga horária: 60h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Agentes Multiplicadores em Educação Ambiental. (Carga horária: 40h).
Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **LIMA, E. G.**, LIRA, R. C., JESUS, ALS, DHALIA, R., FREITAS, A. C.
Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene. Genetics and Molecular Research. , v.13, p.1121 - 1126, 2014.

Livros publicados

1. de Freitas, Antonio Carlos, Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz, Chagas, Bárbara Simas, do Amaral, Carolina Maria Medeiros, Coimbra, Eliane Campos, **de LIMA, Élyda Gonçalves**, da Costa Silva Neto, Jacinto, da Conceição Gomes Leitão, Maria, de Cássia Pereira de Lima, Rita
Infection and Cancer: Bi-Directorial Interactions, 2015

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Marylia Seabra Azevedo. **PERFIL EPIDEMIOLOGICO DO CÂNCER DE MAMA NO HC-UFPE, De janeiro de 2013 A junho de 2015..** 2015. Curso (Enfermagem) - Faculdade Maurício de Nassau - Recife

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. **LIMA, E. G.**
Participação em banca de Maria Susankelly de Melo Santos. **Avaliação da qualidade das baciloscopias de escarros, referente aos anos de 2013 e 2014, realizadas no Hospital Dr. Lídio Paraíba, Pesqueira-PE.**, 2015
(Curso de Especialização em Citologia Clínica) Universidade Federal de Pernambuco
2. **LIMA, E. G.**
Participação em banca de Antonio Francisco de Oliveira Filho. **Entendendo os principais exames de diagnóstico médico para lesões do colo do útero**, 2015
(Curso de Especialização em Citologia Clínica) Universidade Federal de Pernambuco

Graduação

1. FREITAS, A. C., **LIMA, E. G.**, DELLALIBERA, E.

Participação em banca de Kamylla Conceição Gomes Nascimento. **Análise das regiões polimórficas do gene L1 do Papilomavírus humano (HPV) tipo 16 como potenciais marcadores moleculares de progressão de lesões pré-malignas e câncer cervical**, 2014
(Biomedicina) Faculdade Maurício de Nassau - Recife

2. SILVA, ACP, CASTRO, V. T. N. A. E., **LIMA, E. G.**

Participação em banca de Nadege Maria do Nascimento. **ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DE *Peumus boldus* (BOLDO-DO-CHILE)**, 2014
(Farmácia) Faculdade Maurício de Nassau - Recife

3. MACIEL, E. A., **LIMA, E. G.**, CUNHA, F. T.

Participação em banca de Cleine de Barros Cavalcanti. **CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DO Diabetes mellitus GESTACIONAL**, 2014
(Farmácia) Faculdade Maurício de Nassau - Recife

4. FREITAS, A. C., **LIMA, E. G.**, DELLALIBERA, E.

Participação em banca de Bianca de França São Marcos. **Infecções do Papilomavírus humano no desenvolvimento do câncer de pulmão**, 2014
(Biomedicina) Faculdade Maurício de Nassau - Recife

5. SOUZA, T. R. C., **LIMA, E. G.**, XIMENES, S. C. C.

Participação em banca de Amonitta Campos Duque. **Automedicação: um problema de saúde pública**, 2013
(Farmácia) Faculdade Maurício de Nassau - Recife