



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

PEDRO HENRIQUE BEZERRA FONTES

**DETECÇÃO E EXPRESSÃO DE ONCOGENES DO HPV EM
TECIDOS TUMORAIS DE MAMA**

Recife
2024

PEDRO HENRIQUE BEZERRA FONTES

**DETECÇÃO E EXPRESSÃO DE ONCOGENES DO HPV EM
TECIDOS TUMORAIS DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Dra. Vanessa Emanuelle Pereira Santos

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Fontes, Pedro Henrique Bezerra.

Detecção e expressão de oncogenes do HPV em tecidos tumorais de mama /
Pedro Henrique Bezerra Fontes. - Recife, 2024.

70 p. : il.

Orientador(a): Antonio Carlos de Freitas

Coorientador(a): Vanessa Emanuelle Pereira Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

1. Neoplasia mamária. 2. Oncoproteínas. 3. Integração. 4. Papilomavírus
Humano. 5. Infecção. I. Freitas, Antonio Carlos de . (Orientação). II. Santos,
Vanessa Emanuelle Pereira. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

PEDRO HENRIQUE BEZERRA FONTES

**DETECÇÃO E EXPRESSÃO DE ONCOGENES DO HPV EM TECIDOS
TUMORAIS DE MAMA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como pré-
requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 04/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco/ Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia
Experimental - LEMTE

Dr. Joelson Germano Crispim
Universidade Federal de Pernambuco/ Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica Suely
Galdino - NUPIT

Me. Ingrid Andressa de Moura
Universidade Federal de Pernambuco/ Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia
Experimental - LEMTE

Dedico este trabalho a toda a minha família e a todas as mulheres que enfrentam, com coragem e força, o câncer de mama diariamente. Que este estudo possa contribuir para que cada uma delas tenha acesso a um diagnóstico preciso e a um tratamento digno, como elas merecem. A luta de vocês inspira a ciência e a busca incessante por melhores cuidados e esperança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Doutor Antonio Carlos de Freitas por me dar uma chance de desenvolver a pesquisa em seu laboratório e pelo exemplo de pesquisador e ser humano que me inspiram todos os dias.

À minha coorientadora e mãe científica, Doutora Vanessa Emanuelle Pereira Santos, a qual me inspiro pela mulher guerreira, humana e pela grande pesquisadora brasileira, que em meio as dificuldades, consegue sempre nos dar força para seguir em frente como pesquisadores. A ela, o meu eterno agradecimento

Aos meus amigos de laboratório e irmãos científicos, Bia, Stephanie, Gabriel e David, que trilharam esse caminho comigo, principalmente Bia que esteve comigo desde o princípio. Obrigado por serem meus grandes amigos-irmãos e por sempre estarem junto comigo nessa caminhada, apesar de todas as dificuldades.

As minhas tias científicas, Lígia e Bianca, obrigado pelos puxões de orelha, pelos ensinamentos de vida e profissionais e por sempre me apoiarem e incentivarem nesta caminhada de pesquisador. A elas, minha eterna gratidão.

Aos Pós-Docs que compõem o meu laboratório, Anna, Pêu, Larissa e Benigno, obrigado por me aturarem nesta caminhada, por me ensinarem com seus conhecimentos extraordinários e por serem exemplos para mim em todos os aspectos da vida.

A todos que compõem o LEMTE, obrigado pela parceria e laços de amizade que equivalem a uma grande família.

Ao meu pai Pedro, minha mãe Luciana, minha irmã Clara, meus avós André, Glória e Gibson, e toda a família Bezerra e Barros Correia que sempre me apoiaram na escolha da minha profissão, mesmo sabendo das dificuldades encontradas nela.

Gostaria de agradecer também por último, mas não menos importante, os meus amigos, Gabriel, Karina, Caio, Eclesiastes, Suellen, Júlio, Douglas, Hyslane, Beka, Marcela, Laís e todos os outros que por algum momento dessa jornada passaram pela minha vida. Obrigado pela amizade.

"Aos desafios que consumiram horas de
dedicação e esforço, deixo como lembrança
essas páginas, frutos de uma jornada
incansável pela ciência."
*(Inspirado em Machado de Assis, Memórias
Póstumas de Brás Cubas)*

BEZERRA FONTES, Pedro Henrique. **Detecção e Expressão de Oncogenes do HPV em Tecidos Tumorais de Mama**, 2024. 71 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

O Papillomavírus humano (HPV), pertencente à família *Papillomaviridae*, está associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, como cervical, vulvar, peniano, anal e de cabeça e pescoço. Embora o câncer de mama seja um dos que mais afeta mulheres em todo o mundo, a relação entre infecção pelo HPV e esse tipo de câncer ainda não está bem estabelecida, principalmente devido a discrepâncias na detecção e estudos insuficientes sobre a atividade viral no tecido mamário. Diante disso, este estudo teve como objetivo identificar a presença do HPV em tecidos mamários de mulheres com neoplasias e analisar a expressão dos seus oncogenes. Para isso, foram utilizadas técnicas de PCR convencional para detecção de DNA viral (regiões MY e GP) e RT-qPCR para análise da expressão gênica das oncoproteínas virais E5, E6 e E7. A análise demonstrou que amostras negativas pela PCR convencional apresentaram expressão de oncogenes pela RT-qPCR, indicando a importância da técnica para detecção mais sensível. Embora não tenha sido encontrada associação significativa entre as oncoproteínas E6 e E7 e os tipos de câncer, a oncoproteína E5 apresentou maior expressão em cânceres de mama, sugerindo um possível papel na progressão tumoral. Estes achados ressaltam a necessidade de estudos adicionais sobre a atividade do HPV em tumores mamários, com potencial impacto no diagnóstico e tratamento de pacientes com câncer de mama HPV-positivo. Além disso, a compreensão do papel das proteínas do HPV menos exploradas, como E5, se faz essencial para o desenvolvimento de ferramentas que possam ser aliadas no estabelecimento de um tratamento mais assertivo acerca dos cânceres de mama HPV-positivos.

Palavras-chave: Neoplasia mamária. Oncoproteínas. Integração. Papillomavírus Humano. Infecção.

BEZERRA FONTES, Pedro Henrique. **Detection and Expression of HPV Oncogenes in Breast Tumor Tissue.** 2024. 71 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV), belonging to the Papillomaviridae family, is associated with the development of various types of cancers, such as cervical, vulvar, penile, anal, and head and neck cancers. Although breast cancer is one of the most prevalent cancers affecting women worldwide, the relationship between HPV infection and this type of cancer remains unclear, primarily due to discrepancies in detection and insufficient studies on viral activity in breast tissue. In light of this, the aim of this study was to identify the presence of HPV in breast tissues of women with neoplasms and analyze the expression of its oncogenes. To achieve this, conventional PCR techniques were used to detect viral DNA (MY and GP regions) and RT-qPCR was employed for the gene expression analysis of the viral oncoproteins E5, E6, and E7. The analysis revealed that samples negative by conventional PCR showed oncogene expression by RT-qPCR, highlighting the importance of the latter as a more sensitive detection method. Although no significant association was found between the E6 and E7 oncoproteins and cancer types, the E5 oncoprotein exhibited higher expression in breast cancers, suggesting a potential role in tumor progression. These findings emphasize the need for further studies on HPV activity in breast tumors, with potential implications for the diagnosis and treatment of HPV-positive breast cancer patients. Additionally, understanding the role of less explored HPV proteins, such as E5, is essential for developing tools that could contribute to more precise treatment strategies for HPV-positive breast cancers.

Key words: Breast neoplasia. Oncoproteins. Integration. Human Papillomavirus. Infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prevalência mundial do HPV.	17
Figura 2 – Estrutura do genoma do Papilomavírus Humano (HPV)	19
Figura 3 – Ciclo Replicativo do HPV	21
Figura 4 – Caracterização geral das pacientes e dos tumores mamários.	36
Figura 5 – Detecção do HPV por MY e GP utilizando gel de agarose a 2%.	37
Figura 6 – Expressão relativa das oncoproteínas E5, E6 e E7 nos pacientes com câncer de mama HPV's positivo.	38
Figura 7 – Caracterização das pacientes positivas e negativas para HPV	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína Quinase B
AP-1	Proteína Ativadora 1
	Enzima de Edição de RNA Mensageiro de
APOBEC3	Apolipoproteína B
BAK	Antagonista homólogo do BCL
BCL2	Linfoma de Células B 2
Brd4	Proteína 4 contendo Bromodomínio
COX2	Ciclooxigenase-2
c-SCR	Proto-oncogene c-SRC
CXCL14	Quimiocina Ligante de Motivo C-X-C 14
DISC	Complexo de Sinalização Indutor da Morte
DLG1	Homólogo 1 de Discos Grandes
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E2BS	Sítios de Ligação E2
E2F	Fator de Transcrição E2F
E6AP	Proteína Associada a E6
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
FAAD	Fator de Adaptação à Apoptose Dependente de Faz
Fas	Proteína Associada ao Fas com Domínio de Morte
HDC1	Descarboxilase de Histidina 1
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HPV	Papilomavírus Humano
HPV16	Papilomavírus Humano tipo 16
HPV18	Papilomavírus Humano tipo 18
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
HSPGs	Proteoglicanos de sulfato de heparina
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase humana
ID-1	Inibidor da Ligação ao DNA 1
IFN	Interferon
IGF1R	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IL-17	Interleucina-17
IL-18BP	Proteína Ligadora de Interleucina-18
INFB	Interferon Beta
INSR	Receptor de Insulina
IRF1	Fator Regulador de Interferon 1
ISG	Genes Estimulados por Interferon
JAK	Janus Quinase
KDM5B	Demetilase de Lisina 5B
KIP1	Proteína Inibidora de Quinase 1
L1	Proteína Principal do Capsídeo

L2	Proteína Menor do Capsídeo
LCR	Região de Controle Longa
MAML1	Proteína 1 coativadora do tipo Mastermind
MAPK	Quinase de Proteína Ativada por Mitógeno
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MHC I	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NF1	Fator Nuclear 1
NFKB	Fator Nuclear κB
NFX1	Fator de Exportação Nuclear de RNA 1
NHERF1	Fator Regulador do Trocador Na ⁺ /H ⁺ 1
NOTCH	Receptor NOTCH
OCT-1	Fator de Transcrição Ligador de Octâmeros 1
ORI	Origem de Replicação
p105	Precursor da Proteína p105
p107	Proteína p107 ou Proteína do Retinoblastoma Like-1
p130	Proteína p130 ou Proteína do Retinoblastoma Like-2
P21	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 1
P27	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina 1B
p53	Proteína Supressora de Tumor p53
pb	Pares de Bases
PC5/6	Proteína convertase 5/6
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
pRB	Proteína do Gene do Retinoblastoma
PTEN	Homólogo de Tensina
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
SMAD2/3	Homólogo 2/3 de Mothers Against Decapentaplegic
SP1	Proteína de Especificidade 1
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição
STAT1	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
STING	Estimulador de Genes de Interferon
TBP	Proteína Ligadora de TATA
TEF-1	Fator de Aprimoramento Transcricional 1
TLR9	Receptor Toll-like 9
TNFR1	Fator de Necrose Tumoral do Receptor de Transmembrana 1
URR	Região Reguladora a Montante
WAF1	Fragmento Ativado pelo p53 Tipo Selvagem 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	14
2.1.1	Epidemiologia do HPV	15
2.1.2	Estrutura do HPV	17
2.1.3	Ciclo replicativo do HPV na célula hospedeira	19
2.1.4	Mecanismos de integração do HPV	21
2.2	HPV e câncer	23
2.3	Métodos de detecção e expressão do HPV	29
2	OBJETIVOS	31
3	METODOLOGIA	32
3.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS	32
3.2	Extração de DNA e detecção de HPVs de alto risco em tecidos tumorais de mama	32
3.3	Extração de RNA e síntese de cDNA	33
3.4	Análise de expressão relativa via RT-qPCR	34
3.5	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 Introdução

O câncer de mama é considerado um dos cânceres mais prevalentes no sexo feminino, mundialmente, sendo responsável por causar um alto número de óbitos em países subdesenvolvidos (Golrokh Mofrad *et al.*, 2021; Maldonado-Rodríguez *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022). No Brasil, estima-se que a cada ano, de 2023 a 2025, cerca de 73.610 novos casos possam surgir, representando uma incidência de 41,89 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2019; INCA, 2022). O Nordeste, região considerada a segunda com mais casos de câncer de mama do Brasil, apresenta cerca de 15.690 novos casos, com o Estado de Pernambuco apresentando cerca de 2.880 casos (INCA, 2019; INCA, 2022).

Com base nas características clínicas, histológicas e propriedades biológicas, o câncer de mama pode ser estratificado (Russnes *et al.*, 2017). Com o auxílio da biologia molecular, o câncer de mama pode ter várias classificações em subtipos que correspondem a Luminal A, Luminal B, HER2-enriquecido, basal like e normal-like (Russnes *et al.*, 2017). Os tumores triplo-negativo e positivos para HER2, possuem um prognóstico menos favorável se comparado aos tumores Luminal A e Luminal B (Piana *et al.*, 2014; Balci *et al.*, 2019; De Carolis *et al.*, 2019). Por outro lado, classificações mais precisas, como a por *clusters* integrativos, estruturam os tumores de mama em 10 subtipos genômicos com base no número de cópias de DNA e na expressão gênica, aprimorando a classificação molecular do câncer de mama (Young *et al.*, 2023).

Com relação a classificação citopatológica, o câncer de mama pode ser classificado em cinco categorias distintas, conforme a classificação de Yokohama: C1 que consiste em material insuficiente; C2 que são considerados tumores benignos; C3 que é considerado tumores atípicos; C4 que é considerado tumores suspeito de malignidade e; C5 que são tumores malignos (Hoda; Brachtel, 2019). A categoria C2 possui um prognóstico melhor do que a categoria C5, apresentando lesões benignas, como fibroadenoma, que possuem um risco de cerca de 1% para a malignidade (Yadav *et al.*, 2024). Já a categoria C5 está associada a lesões malignas e possuem um risco para a malignidade de cerca de 100% (Yadav *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2023).

Fatores de risco, como estilo de vida e ambientais, já foram associados como contribuintes para o desenvolvimento de tumores mamários (Alinezhadi *et al.*, 2022; Gupta *et al.*, 2021). Entretanto, fatores genéticos, idade avançada, raça, etnia e história reprodutiva, também têm sido amplamente investigados como fatores

relevantes no desenvolvimento do câncer (Lukasiewicz *et al.*, 2021). Apesar de ainda ser controverso, vírus como, Epstein-Barr, citomegalovírus, herpes-simplex-1 e o Papilomavírus Humano (HPV) vem sendo considerados como potenciais fatores oncogênicos do tecido mamário a alguns anos (Herrera-Goepfert *et al.*, 2011; Schiffman *et al.*, 2007; Petry *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2016; Kazemi Aghdam *et al.*, 2019). Estudos sugerem que o HPV por meio do contato com o epitélio e a mucosa, possa, através do sexo oral ou pela corrente sanguínea, alcançar o tecido mamário e ocasionar a carcinogênese mamária (Bodaghi *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2021). Entretanto, a relação do HPV e câncer de mama ainda precisa ser estudada, principalmente devido à grande variabilidade de porcentagem de detecção do vírus no tecido mamário, bem como a existência de poucos estudos que envolvam a atividade e/ou expressão viral (Cavalcante *et al.*, 2018).

A detecção do vírus do HPV é comumente realizada pela detecção da região L1 do vírus que é altamente conservada e permite a identificação de vários tipos de HPV (Fuessel Haws *et al.*, 2004; Shen-Gunther; Yu, 2011). No entanto, durante o processo de integração viral, pode haver perda total ou parcial da região L1, podendo ocasionar subidentificação da infecção por esse vírus (Tjalma; Depuydt, 2013). O presente estudo foi desenvolvido no intuito de identificar o HPV em tecidos mamários utilizando o método de detecção da região L1 e a expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 do HPV-16, visando quantificar a prevalência do vírus em pacientes de Pernambuco e avaliar dois diferentes métodos de detecção para o HPV.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus pertencente à família Papilomaviridae, possui a sua disseminação principalmente pela via sexual e está associado ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres, incluindo cânceres penianos, vulvares, vaginais, anais, de colo uterino e de cabeça e pescoço (Liu *et al.*, 2016; Anna Szymonowicz *et al.*, 2020; Kudela *et al.*, 2022). Atualmente, mais de 200 genótipos de HPV, classificados em HPV de alto (16, 18, 23, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 66, 68, 73 e 82) e baixo risco (6, 11, 40 e 42) são encontrados espalhados

pelo mundo, dos quais os de alto risco estão associados à carcinogênese, principalmente a de colo uterino (Ullah *et al.*, 2023). Os de baixo risco incluem o HPV6 e o HPV11 como os principais representantes, sendo responsáveis por causar doenças benignas, como verrugas genitais (Egawa; Doorbar, 2017). Esses genótipos são agrupados em gêneros alfa, nu/Mu, beta e gama de acordo com o tropismo para os tecidos epiteliais humanos e genoma viral (De Villiers *et al.*, 2004; De Villiers *et al.*, 2013). O gênero alfa inclui os HPV's associados a carcinogênese, enquanto os gêneros beta e gama normalmente geram infecções do tipo assintomática. No entanto, em pacientes imunossuprimidos, esses gêneros podem levar ao desenvolvimento de papiloma cutâneo ou aumentar a predisposição para o câncer de pele (Doorbar *et al.*, 2012).

A infecção pelo HPV pode se alastrar em homens e mulheres, embora as mulheres acabem sendo mais atingidas devido a sua alta susceptibilidade à infecção nas células cervicais (De Martel *et al.*, 2012). A maioria das infecções pelo HPV não ocasionam doenças ou sintomas, sendo o vírus eliminado em torno de 12 a 24 meses após a infecção e apenas um pequeno número progredindo para uma lesão pré-neoplásica que pode resultar em um processo cancerígeno (De SanJose *et al.*, 2017). Embora ainda seja bastante controverso, alguns fatores comportamentais que incluem tabagismo, início precoce da primeira relação sexual, maior número de parceiros sexuais, maior tempo de uso de contraceptivos hormonais, histórico de IST, além de imunossupressão e infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Herpes simplex* podem estar relacionados com a aquisição e persistência da infecção pelo HPV, levando conseqüentemente ao desenvolvimento de lesões (Roset Bahmanyar *et al.*, 2012). Apesar de sua prevalência mundial ser alta, principalmente em mulheres jovens, a vacinação e o rastreio são as principais formas de reduzir as doenças relacionadas ao HPV (De SanJose *et al.*, 2018; Burchell *et al.*, 2006).

2.1.1 Epidemiologia do HPV

A nível global, é observado que as cepas de alto risco 16, 18, 52, 31, 58, 39, 56 e 51 do HPV são as mais frequentes em todo o mundo, sendo as cepas 16 e 18 do HPV responsáveis por cerca de 55% e 14% dos cânceres de colo de útero, respectivamente (Richter *et al.*, 2013; Husain; Ramakrishnan, 2016; Wentzensen *et al.*, 2017; Bruni *et al.*, 2019). Com relação às cepas de baixo risco, o HPV6 é o mais

comumente encontrado em todo o mundo, representando cerca de 2% na América do Norte, 0,9% na América Latina e 0,2% na Ásia (Satanova *et al.*, 2022).

Na Europa, os países do norte possuem uma prevalência geral do HPV superior a 10% em relação a Europa Ocidental e Europa Meridional que apresentam uma prevalência geral para o HPV em torno de 9% (Bruni *et al.*, 2010). Contudo, o leste da Europa apresenta uma prevalência ainda mais elevada de cerca de 29,1% e 21,4% (De SanJosé *et al.*, 2007; Bruni *et al.*, 2010). Dentre os tipos mais prevalentes, estudos demonstram que o HPV33 é o tipo mais presente na Europa (Lifford; Tully; Franceschi, 2017; FDA, 2019). Em relação ao continente africano, a prevalência do HPV varia de 33% na África Oriental, 29% na África Ocidental e de 17% na África Austral, possuindo o HPV16, HPV58, HPV51, HPV66 e HPV18 os tipos mais comuns existentes na África do Sul (Satanova *et al.*, 2022). Na Ásia, a prevalência do HPV se apresenta em torno de 8% com predominância para os HPV's do tipo 52 e 58 (Satanova *et al.*, 2022)

A prevalência do HPV na América Latina é de cerca de 12,3% para a América do Sul, e 20,4% para a América Central, tendo o HPV31 como uma cepa comum nessas regiões (De SanJosé *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2013; Wentzensen *et al.*, 2017). No Brasil, a infecção cervical pelo HPV16 se apresenta com uma prevalência que varia de 13,7% a 54,3% (Ayres; Silva, 2010). Na região nordeste do país, estudos mostram que HPV's dos tipos 16, 31, 33 e 58 são os mais encontrados em amostras cervicais (Veríssimo Fernandes, 2011; Gurgel *et al.*, 2015). Já no Estado de Pernambuco, estudos mostram que o HPV16 é o tipo mais comumente encontrado. (Ngozi Dom-Chima *et al.*, 2021). Entretanto, os HPVs 31, 33, 53, 56, 58, 66 e 70 também são encontrados com alta frequência no Estado de Pernambuco (Ngozi Dom-Chima *et al.*, 2021).

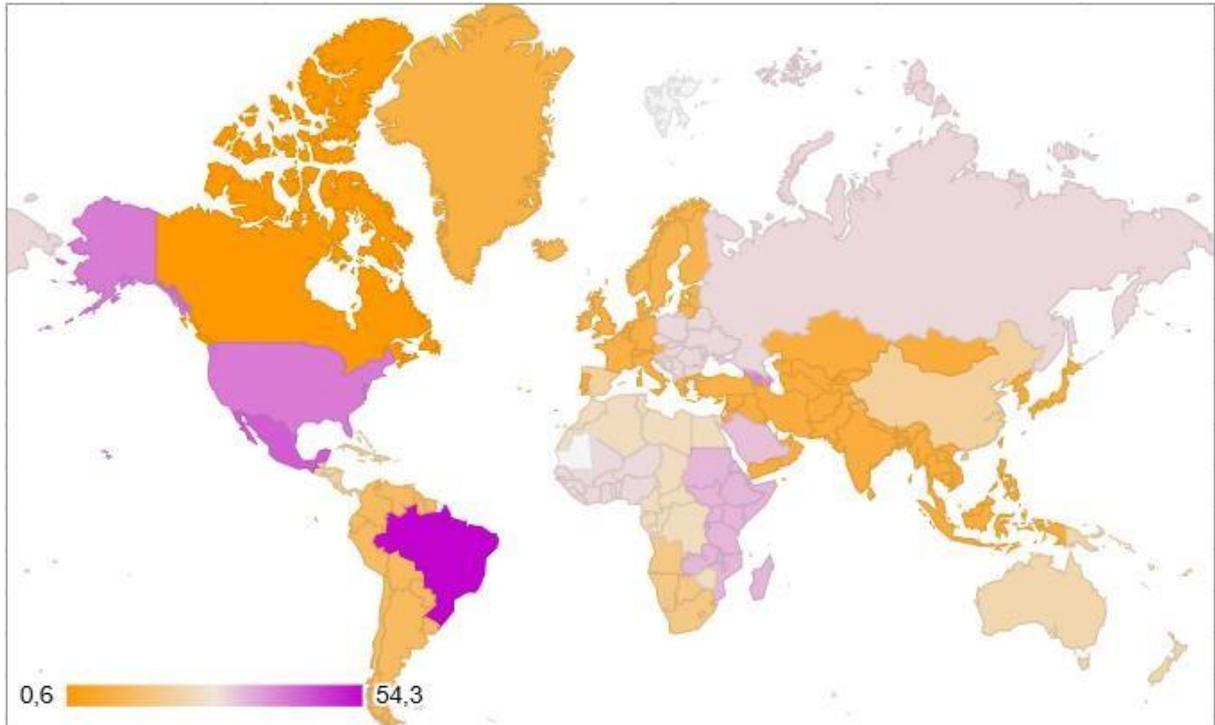


Figura 1: Prevalência mundial do HPV. Fonte: O autor (2024).

2.1.2 Estrutura do HPV

O HPV é um vírus não envelopado, com 52 a 55nm de diâmetro que possui um DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8kb (O'Connor *et al.*, 1995; Pastrana *et al.*, 2018; Tirosch *et al.*, 2018; McBride, 2022). O seu DNA é separado por dois sinais de poliadenilação e possui três regiões distintas: uma região reguladora a montante (URR), uma região precoce (E) e uma região tardia (L) (O'Connor *et al.*, 1995). A região a montante, também conhecida como região de controle longa (LCR) não codifica nenhuma proteína e possui tamanhos diversos dependendo da cepa do HPV, sendo 853pb no HPV16 e 825pb no HPV18 (Yu; Majerciak; Zheng, 2022). Na região LCR também se encontram todos os promotores virais que irão variar de número de acordo com o papilomavírus (Yu; Majerciak; Zheng, 2022).

As atividades dos promotores virais ficam sujeitas a regulação dos fatores de transcrição do hospedeiro e as modificações da cromatina, visto que, o HPV não consegue codificar a sua própria RNA polimerase, utilizando então a RNA polimerase II do hospedeiro (Proundfoot, 2016). Os transcritos produzidos pelo HPV são então poliadenilados em um local precoce ou tardio utilizando uma maquinaria de

poliadenilação do próprio hospedeiro (Tian; Manley, 2017; Yu; Majerciak; Zheng, 2022). A região LCR também possui locais de ligações para as proteínas E1 e E2 do HPV iniciarem o processo de replicação (O'Connor *et al.*, 1995)

Diversos fatores de transcrição, como Fator Nuclear I (NFI), Fator de Transcrição Ligador de Octâmeros 1 (Oct-1), Proteína Ativadora 1 (AP-1), Fator de Aprimoramento Transcricional 1 (TEF-1) e Proteína de Especificidade 1 (SP1), são necessários para a iniciação da transcrição, além da origem de replicação (ORI), essencial para que o HPV realize a sua replicação (O'Connor *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2018). A região precoce do HPV é responsável por codificar sete proteínas virais não estruturais: E1, E2, E1 ^ E4, E5, E6, E7 e E8 ^ E2 (Zur Hausen, 2002; McBride; Oliveira; McPhillips, 2006). As proteínas E4 e E8 são codificadas juntamente com as proteínas E1 e E2, respectivamente, visto que o HPV possui um mecanismo capaz de transcrever seus RNAs como mRNAs policistrônicos que permitem a codificação de múltiplas proteínas virais (Kozak, 1986; Kozak, 1999).

Com relação a proteína E1, ela é uma helicase essencial no processo de replicação viral (Zur Hausen, 2002; McBride; Oliveira; McPhillips, 2006). Já a proteína E2 é uma proteína acessória da proteína E1 e atua também como repressora ou ativadora da transcrição viral, além de realizar a segregação do genoma viral durante o processo de mitose (Zur Hausen, 2002; McBride; Oliveira; McPhillips, 2006). E5, E6 e E7 são oncoproteínas responsáveis por promover a evasão imune, imortalização e transformação celular (Roman; Munger, 2013; Vande Pol; Klingelhutz, 2013).

As oncoproteínas E6 e E7 conseguem degradar vários genes supressores de tumor e micro RNAs (miRNAs), anulando os pontos de verificação do ciclo celular (Zheng; Wang, 2011; Roman; Munger, 2013; Vande Pol; Klingelhutz, 2013). A proteína E6 interage com o gene supressor tumoral p53 e a E7 com a pRB, duas proteínas que são essenciais para a estabilidade genômica e para o controle do ciclo celular, promovendo assim, o desenvolvimento do câncer (Munger *et al.*, 2004; Kadaja *et al.*, 2009; Bester *et al.*, 2011; Roman; Munger, 2013; Spriggs; Laimins, 2017). A proteína E8 é responsável por inibir a expressão e a replicação do vírus (Yu; Majerciak; Zheng, 2022). Já a proteína E4 tem o papel de facilitar a saída do vírus, sendo expressa no final do processo de replicação viral (Wang *et al.*, 2009; McIntosh *et al.*, 2010; Yu; Majerciak; Zheng, 2022). Na região tardia, são encontrados os genes responsáveis por codificar as proteínas L1 e L2 que compõem a estrutura do capsídeo viral (Wang *et al.*, 2017a)

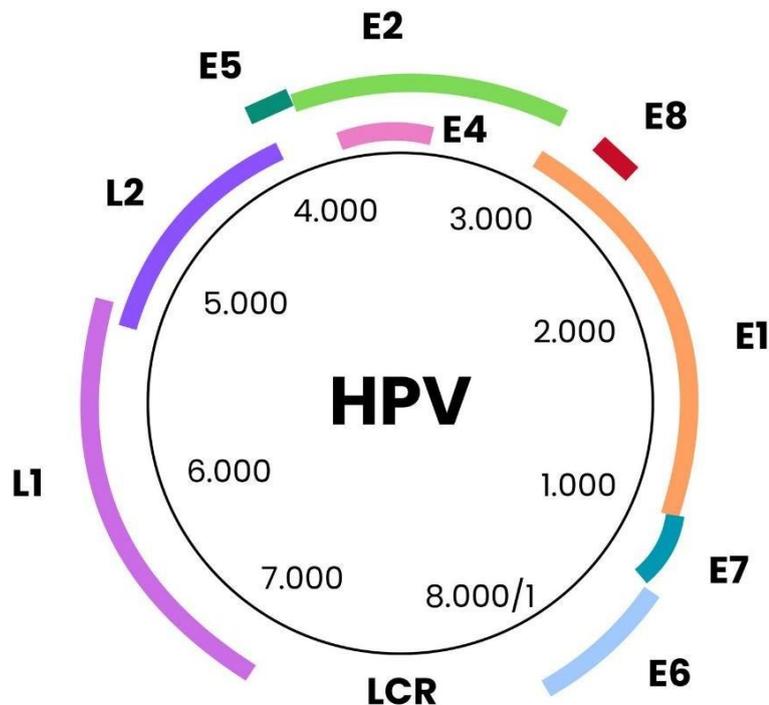


Figura 2: Estrutura do genoma do Papilomavírus Humano (HPV). As proteínas não estruturais do HPV E1, E2, E4, E5, E6, E7 e E8 estão mostradas nas cores laranja, verde claro, rosa, verde escuro, azul claro, azul escuro e vermelho respectivamente. As proteínas do capsídeo viral da região tardia, L1 e L2, estão de rosa e roxo, respectivamente. Fonte: O Autor (2024).

2.1.3 Ciclo replicativo do HPV na célula hospedeira

Por meio de microlesões e de um mecanismo de endocitose, o HPV adentra o epitélio (Doorbar, 2005; Di Giuseppe *et al.*, 2017). A proteína L1 do capsídeo se liga aos receptores primários, os proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs), que estão localizados nas células da camada basal (Schiller *et al.*, 2010; Raffa *et al.*, 2013). Após se ligarem, ocorre uma modificação conformacional no capsídeo viral mediada pela ciclofilina B, promovendo uma exposição do terminal N da proteína L2 (Bienkowska-Haba *et al.*, 2009). O terminal N é clivado pela furina ou pela proteína convertase 5/6 (PC5/6) permitindo a ligação a um receptor secundário na membrana da célula, que pode ser, segundo estudos, fator de crescimento epidérmico (EGFRs), integrinas (integrina alfa 6), microdomínios de membrana enriquecidos com tetraspanina, lamininas, sindecan-1, heterotetrâmero de anexina-A2 e vimentina

(Evander *et al.*, 1997; Shafti-Keramat *et al.*, 2003; Culp *et al.*, 2006; Surviladze *et al.*, 2012; Woodham *et al.*, 2012; Dziduszko *et al.*, 2013; Schäfer *et al.*, 2017).

Após entrar nas células, o genoma epissomal (circular) do vírus é transportado até o núcleo por meio de uma via mediada pela tubulina e o adentra através dos poros nucleares ou após a quebra da membrana nuclear no processo de mitose da célula (Pyeon *et al.*, 2009; Aydin *et al.*, 2014). Chegando no núcleo, a transcrição viral precoce realizada pelas proteínas E1 e E2 se inicia (Graham, 2017). E2 se liga a proteína E1 na origem da replicação viral, recrutando então a maquinaria de replicação do DNA viral (Sanders; Stenlund, 2000). Nessa fase, ocorre também o controle da replicação viral por meio da proteína E8 ^ E2 que controla a replicação por meio do complexo celular Ncor/SMRT (Dreer *et al.*, 2017).

A replicação do DNA viral nas células basais ocorre em conjunto com a replicação do DNA das células infectadas (Graham, 2017). Quando ocorre a divisão das células filhas na mitose, o E2 ligado a região LCR do HPV e as proteínas de ligação a cromatina, como o Brd4, permite que o DNA viral seja propagado para as células geradas no processo mitótico (McBride, 2013; Graham, 2017). As oncoproteínas E6 e E7 também irão possuir um papel essencial no processo de replicação viral, principalmente na segunda fase produtiva da replicação, nas células das camadas médias e superiores (Stoler *et al.*, 1989; Beyer-Finkler *et al.*, 1990).

A proteína E6 é essencial para a manutenção do genoma epissômico e a proteína E7 é capaz de ativar o ponto de verificação da fase G1 para S dos queratinócitos, sendo necessária para a segunda fase produtiva da replicação viral (Thomas *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002 Wang *et al.*, 2009; Roman; Munger, 2013; Graham, 2017). E7 ativa o ciclo celular degradando proteínas como, pRB, p107 e p130 que fazem parte de um complexo de repressão transcricional que contém o fator de transcrição E2F (Graham, 2017). Com a degradação das proteínas que compõem o complexo, E2F fica livre e ativa vários genes que estão relacionados com o ciclo celular, como as ciclinas A e E que permitem a passagem da célula da fase G1 para a fase S (Moody; Laimins, 2010).

Na fase final da replicação, ocorre a formação dos vírions, a replicação vegetativa do DNA viral e um aumento da expressão das proteínas E1, E2, E4 e E5 (Bodily; Meyers, 2005; Spink *et al.*, 2005; Graham, 2010). As proteínas E4 e E5 possui funções adicionais no ciclo de vida do HPV (Prescott *et al.*, 2014). A proteína E4 é responsável por romper os filamentos de citoqueratina e inibir a formação do envelope

cornificado nas células epiteliais, tornando as células mais frágeis e mais propensas a liberar os vírions (Graham, 2010). Já a proteína E5 tem o papel de regular a apoptose por meio das vias EGFR, Quinase de Proteína Ativada por Mitógeno (MAPK) e Proteína Quinase B (AKT), além de ajudar o vírus a escapar da resposta imune reprimindo o transporte de Complexo de Histocompatibilidade (MHC) para a superfície celular (Ashrafi *et al.*, 2006; DiMaio; Petti, 2013).

Por fim, os vírions são liberados por meio das proteínas L1 e L2. L2 é sintetizada antes da proteína L1 e é direcionada para o núcleo (Becker *et al.*, 2003). As proteínas L1 sintetizadas, se complexam em capsômeros pentaméricos no citoplasma e são levadas para o núcleo (Nelson *et al.*, 2002). L1 e L2 interagem entre si e L2 é incorporada nos centros dos capsômeros (Florin *et al.*, 2002; Buck *et al.*, 2005). Com os virions totalmente formados, ocorre a sua liberação das células que são eliminadas na superfície epitelial (Bryan; Brown, 2000).

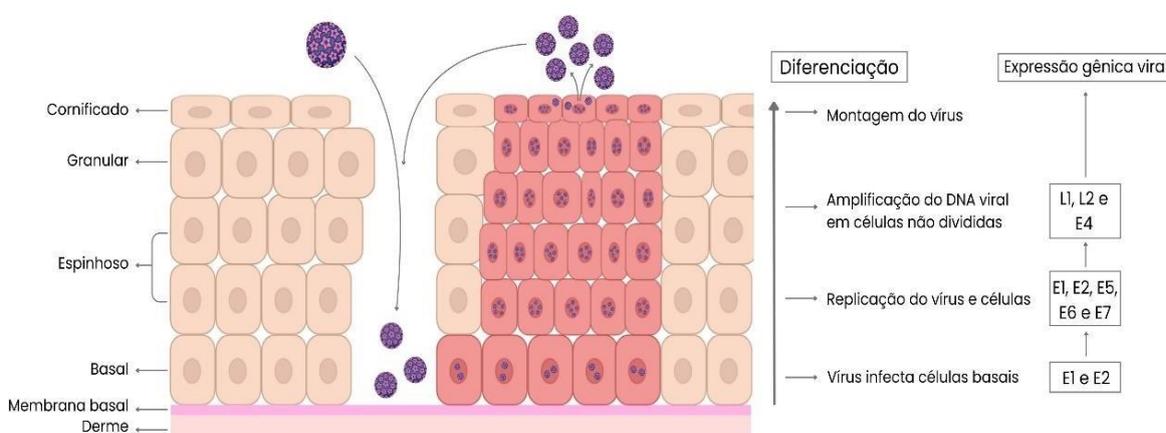


Figura 3: Ciclo replicativo do HPV. Ciclo replicativo do HPV desde momento da sua penetração no epitélio até o momento de montagem viral e liberação dos vírions pelas células epiteliais. Fonte: O Autor (2024)

2.1.4 Mecanismos de integração do HPV

Após infectar as células, o HPV pode se encontrar em diferentes estágios de infecção: genomas virais extracromossômicos, genomas integrados do HPV ou misto, tendo o estado integrado do HPV como um pior prognóstico para o hospedeiro, em comparação com o estado extracromossômico (Shukla *et al.*, 2014; Mulherkar *et al.*, 2015). Estudos mostram que com relação a integração do HPV no genoma humano,

não há um local específico que ele possa se integrar (Hatano *et al.*, 2021). Entretanto, existem alguns locais de integração que são observados frequentemente e são chamados de “*hotspots* genômicos” (Thorland *et al.*, 2000; Thorland *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2016;). Esses *hotspots* são considerados locais frágeis do DNA que estão propensos a quebras em resposta ao estresse gerado pela replicação do DNA, regiões transcricionalmente ativas e marcas de cromatina abertas (Thorland *et al.*, 2000; Thorland *et al.*, 2003; Bodelon *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2016; Kelley *et al.*, 2017).

Para se integrar ao genoma do hospedeiro, estudos mostram que o HPV sofre clivagem principalmente na região de E1, suprimindo então, a função da proteína E2 e provocando instabilidade cromossômica no local em que houve o processo de integração (Hatano *et al.*, 2021). A função de E2 também pode ser comprometida devido a quebras na região derivada do processo de integração, que levam a perda funcional do gene, ou na metilação dos sítios CpG localizados na E2BS da região LCR do HPV (Park *et al.*, 1997; Arias-Pulido *et al.*, 2006; Cricca *et al.*, 2009; Vinokurova; Doeberitz, 2011; Jacquin *et al.*, 2013; Reuschenbach *et al.*, 2015; Kelley *et al.*, 2017). No entanto, já foi relatado que a clivagem pode ocorrer em outras regiões, como E7, LCR e E6 (Fradet-Turcotte *et al.*, 2011; Sakakibara *et al.*, 2011; Akagi *et al.*, 2013; Khoury *et al.*, 2013; Parfenov *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Network, 2015; Hatano *et al.*, 2021).

Acredita-se que a entrada do vírus na célula hospedeira promove a metilação de E2 via DNA metiltransferase-1, ou quando a integração do vírus no genoma do hospedeiro ativa maquinaria celular de metilação (Kim *et al.*, 2003; Badal *et al.*, 2004; Kalantari *et al.*, 2004; Van Tine *et al.*, 2004; Kalantari *et al.*, 2008; Vinokurova; Doeberitz, 2011; Fertey *et al.*, 2020; Rosendo-Chalma *et al.*, 2024). Estudos mostram que após o processo de integração do HPV, pode ocorrer uma perda parcial ou total da região L1 que pode comprometer no diagnóstico do HPV, visto que atualmente a detecção do vírus ocorre, principalmente, pela amplificação por PCR de regiões conservadas de L1, a MY09/11 e GP5+/GP6+ (Tjalma; Depuydt, 2013).

Com relação aos padrões de integração do HPV, há uma classificação baseada em dois tipos: quando apenas uma cópia do HPV é integrada ou quando múltiplas cópias do HPV são integradas como repetições cabeça – cauda em *tandem* (Hatano *et al.*, 2021). As repetições cabeça-cauda em *tandem* ocorrem quando sequências de DNA repetidas do HPV se alinham linearmente ao longo da molécula de DNA do hospedeiro, podendo então causar problemas na estabilidade do genoma do

hospedeiro (Nachira *et al.*, 2024). Quanto ao mecanismo de integração, estudos propõem que a integração ocorra por meio de um “modelo de *loop*”, que se baseia na duplicação de cópias do genoma do hospedeiro em uma região adjacente ao local de integração do HPV, podendo gerar instabilidade no genoma e contribuir para o desenvolvimento do câncer (Akagi *et al.*, 2013).

Outro tipo de mecanismo de integração que vem sendo estudado é o mecanismo de integração chamado de “tipo III” que se baseia em cópias em *tandem* do genoma do HPV intercalando com a molécula de DNA celular (Warburton *et al.*, 2018). Sendo assim, entender os mecanismos de integração que o HPV pode ter ao longo do processo infeccioso auxilia na compreensão e determinação de qual o(s) melhor(es) métodos de detecção a serem utilizados.

2.2 HPV e Câncer

As proteínas E6 e E7 dos HPV's de alto risco são as principais responsáveis no desenvolvimento da carcinogênese, possuindo várias funções que contribuem para esse processo (Hanahan; Weinberg, 2011; Doorbar *et al.*, 2015). A proteína E6 do HPV é capaz de interagir e direcionar as proteínas p53 e antagonista homólogo do BCL (BAK), que são essenciais no processo de inibição da parada do crescimento celular e apoptose após danos ao DNA, para a degradação (Scarth *et al.*, 2021). Também já foi demonstrado que a oncoproteína E6 é capaz de provocar a imortalização celular por meio da ativação do complexo da telomerase (Katzenellenbogen, 2017). Segundo alguns estudos, E6 regula positivamente a subunidade catalítica da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), permitindo que a célula se torne imortal (Klingelutz *et al.*, 1996; Veldman *et al.*, 2001).

Diferentemente das proteínas E6 dos HPV's de baixo risco, a proteína E6 dos HPV's de alto risco possuem um motivo de ligação PDZ, conhecido como PBM, que por meio deles consegue interagir com proteínas que contém o domínio PDZ, levando a sua degradação e implicando na transformação celular (Vande Pol; Klingelutz, 2013; Thomas; Banks, 2021). A proteína E6 também possui a capacidade de desregular a via extrínseca da apoptose, por meio de interações com a caspase-8 e o FAAD, levando a degradação dessas proteínas e inibindo a sinalização de morte programada da célula (Filippova *et al.*, 2004; Garnett *et al.*, 2006).

A proteína E6 do HPV consegue se ligar a região terminal C do fator de necrose tumoral do receptor de transmembrana (TNFR1) interrompendo a sinalização pró-apoptótica (Filippova *et al.*, 2002; Scarth *et al.*, 2021). Vale ressaltar que a proteína E6 é capaz também de desregular várias vias que estão relacionadas a proliferação e diferenciação celular (Scarth *et al.*, 2021). Uma dessas vias é a via de sinalização NOTCH essencial para a regulação da proliferação e diferenciação celular (Bray, 2016). A via é ativada após a ligação do receptor ligante NOTCH na superfície das células, induzindo uma cascata de eventos que no final liberará o domínio intracelular NOTCH, conhecido como NICD, que se desloca para o núcleo juntamente com a proteína 1 coativadora do tipo Mastermind (MAML1), estimulando a transcrição de genes relacionados a proliferação e diferenciação celular (Ntziachristos *et al.*, 2014). Em vários tipos de cânceres já se foi observado uma ativação exacerbada dessa via, inclusive em cânceres cervicais induzidos pelo HPV16, no qual o receptor NOTCH1 já foi encontrado regulado positivamente (Zagouras *et al.*, 1995; Vliet-Gregg *et al.*, 2013).

Outra via essencial na proliferação celular que é desregulada nos mais diversos tipos de cânceres humanos, inclusive em cânceres associados ao HPV, é a via da PI3K/AKT/mTOR (Contreras-Paredes *et al.*, 2009). A PI3K é ativada pelos receptores de tirosina quinases (RTKs), permitindo a fosforilação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) que gera o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), um mensageiro que possui curta duração (Contretas-Paredes *et al.*, 2009). Entretanto, essa via pode ser inativada por meio do homólogo de tensina (PTEN), um supressor tumoral (Contreras-Paredes *et al.*, 2009).

Estudos indicam que a proteína E6 foi capaz de se ligar e degradar a proteína homólogo 1 de discos grandes (DLG1), que possui um domínio PDZ e se liga ao PTEN, promovendo a sua estabilização (Adey *et al.*, 2000; Contretas-Paredes *et al.*, 2009). Além disso, foi observado também que a E6 é capaz de degradar uma proteína conhecida como fator regulador de troca N+/H+ (NHERF1), capaz de recrutar a proteína PTEN e paralisar a via de sinalização, permitindo a sinalização descontrolada da via PI3K/AKT (Takahashi *et al.*, 2006; Accardi *et al.*, 2011).

Estudos mostraram que a E6 também foi capaz de hiperativar uma série de receptores de tirosina quinases, como o EGFR, o receptor de insulina (INSR) e o receptor do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1R), contribuindo então para a ativação da via PI3K/AKT/mTOR nos queratinócitos do prepúcio que

expressam a oncoproteína E6 do HPV16 (Spangle; Munger, 2013). Além disso, E6 se liga à ubiquitina ligase E6AP e p53 impedindo que a célula entre em um processo apoptótico que possa ser induzido pelas mudanças ocasionadas na célula pela proteína E7 (Moody; Laimins, 2010; Martinez-Zapien *et al.*, 2016).

Outra via desregulada nos cânceres induzidos pelo HPV é a via da JAK/STAT (Thakur *et al.*, 2023). A sua desregulação é capaz de promover a progressão do câncer, evasão imunológica e metástase (Thomas *et al.*, 2015). A ativação da via ocorre quando citocinas, interleucinas e fatores de crescimento se ligam a receptores de membrana ativando as JAK's que recrutam, fosforilam e ativam as proteínas STAT (Morgan *et al.*, 2018). Os dímeros de STAT se deslocam para o núcleo e se ligam a sequências promotoras específicas induzindo a transcrição de genes (Morgan *et al.*, 2018). Uma STAT bastante estudada é a STAT3 que se torna essencial para a proliferação contínua das células suprabasais (Scarth *et al.*, 2021).

Ademais, estudos mostram que nos cânceres cervicais, a fosforilação da STAT3 está aumentada, sendo muito provável que a E6 seja responsável pelo aumento de sua fosforilação e consequente ativação exacerbada da via de sinalização (Morgan *et al.*, 2018; Morgan; Macdonald, 2020). Consequentemente, a ativação exacerbada da STAT3 permite uma maior liberação da citocina pró-inflamatória IL-6 que é responsável por uma ativação autócrina e parácrina dessa via (Morgan; Macdonald, 2019a).

Com relação a oncoproteína E7, sabe-se que ela é responsável por reprimir a resposta imunológica, algo que se torna essencial para a manutenção do câncer (Law *et al.*, 2020). A proteína E7 é capaz de se ligar a proteína STING inibindo a via de sinalização cGAS-STING que é importante no reconhecimento de antígenos (Lau *et al.*, 2015). A E7 também é capaz de promover o silenciamento epigenético do sensor de DNA de fita dupla, o receptor Tool-like 9 (TLR9), por meio da via de recrutamento de KDM5B e da histona desacetilase HDC1 para o promotor TLR9, impedindo assim, a produção de IFNs do tipo I que são essenciais no combate a infecções virais (Hasan *et al.*, 2013). Outrossim, E7 também é capaz de diminuir a ativação de NFkB, um fator de transcrição que tem um importante papel na imunidade (Richards *et al.*, 2015).

A diminuição do NFkB pela oncoproteína E7 leva a redução da secreção de citocinas pro-inflamatórias, suprimindo o sistema imunológico (Richards *et al.*, 2015). O aumento da expressão da proteína E7 aumenta a secreção da proteína de ligação à IL18 (IL-18BP), uma citocina anti-inflamatória (Richards *et al.*, 2014). Presume-se

ainda que a E7 se liga ao terminal C da proteína IRF1 impedindo que ela se ligue ao DNA e expresse genes que são essenciais para a resposta imunológica, como o $\text{INF}\beta$ (Park *et al.*, 2000). A supressão do sistema imunológico pode estar associada também a uma redução da expressão de CXCL14, uma quimiocina que é capaz de promover o aumento da infiltração de células imunológicas e suprimir o crescimento tumoral (Cicchini *et al.*, 2016). Essa redução de CXCL14 já foi encontrada em cânceres de cabeça e pescoço positivos para HPV e cânceres cervicais (Bergot *et al.*, 2014; Cicchini *et al.*, 2016). Em adicional, estudos demonstram que a proteína E7 pode estar associada ao aumento ou inibição da atividade de alguns fatores de transcrição que contribuem para a proliferação celular, como STAT1, IRF1, SMAD2/3, TBP e MIZ-1 (Dyson *et al.*, 1989; Helt; Galloway, 2001; Moody; Laimins, 2010; Songock *et al.*, 2017).

A oncoproteína E5 pode ativar EGFR, induzindo a expressão do receptor do fator de crescimento c-Met, um oncogene potente (Scott *et al.*, 2018). Ademais, a oncoproteína E5 pode também regular diretamente a progressão do ciclo celular através da inibição p21 e p27 (Tsao *et al.*, 1996; Pedroza-Saavedra *et al.*, 2010). E5 pode regular negativamente a expressão do receptor de morte na superfície celular Fas (FAS) e inibir o recrutamento da proteína associada aos Fas com domínio de morte (FADD), impedindo a formação de um complexo conhecido como DISC, essencial para a propagação do sinal apoptótico (Kabsch *et al.*, 2004).

A proteína E5 pode também estar associada com a modulação da resposta imunológica, sendo responsável por interferir negativamente na expressão de receptores imunológicos, como o Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classes I (MHCI) e II (MHCII) (Zhang *et al.*, 2003; Ashrafi *et al.*, 2005; Gruener *et al.*, 2007; Campo *et al.*, 2010; Miura *et al.*, 2010). E5 é capaz de se ligar diretamente ao MHC de classe I, por meio do seu domínio transmembranar, retendo o MHC de classe I dentro do complexo de golgi e impedindo o seu tráfego até a superfície celular (Ashrafi *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2010). Ademais, a E5 pode também alterar a via de sinalização do interferon (IFN) por meio da supressão de STAT1, impedindo então a transcrição de genes estimulados por interferon (ISG) que são responsáveis por atividades antivirais e de regulação imunológica (Scott *et al.*, 2020).

2.2.1 HPV e câncer de mama

Etiologias virais vem sendo bastante estudadas ao longo dos anos como possível causador do desenvolvimento de neoplasias mamárias (Silva; Da Silva, 2011). Vírus como, Epstein-Barr, citomegalovírus, herpes-simplex-1 e o HPV vem sendo considerados como potenciais fatores oncogênicos do tecido mamário a alguns anos (Schiffman *et al.*, 2007; Herrera-Goepfert *et al.*, 2011; Petry *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2016; Kazemi Aghdam *et al.*, 2019). Estudos sugerem que o HPV possa chegar ao tecido mamário e ocasionar o câncer por meio do contato com o epitélio, com a mucosa através do sexo ou por meio da corrente sanguínea (Bodaghi *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2021).

A infecção pelo HPV já foi identificada em todos os subtipos de câncer: Luminal A, Luminal B, positivo para HER2 e triplo-negativo (Islam *et al.*, 2020). Entretanto, se é relatado uma presença aumentada do HPV em tumores triplo-negativo e positivos para HER2, que possuem um prognóstico pior quando comparados aos tumores Luminal A e Luminal B (Piana *et al.*, 2014; Balci *et al.*, 2019; De Carolis *et al.*, 2019).

Grande parte do desenvolvimento do câncer de mama induzido pelo HPV ocorre pela interação das oncoproteínas E6 e E7 com diversas proteínas existentes em nossas células que estão associadas a proliferação celular (Wang *et al.*, 2003). Estudos mostram que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV podem interagir com o gene-1 e 2 de susceptibilidade ao câncer de mama e ovário (BRCA1 e BRCA2) antagonizando as funções dessas proteínas que são importantes na prevenção do desenvolvimento do tumor ao repararem danos ao DNA (Rosen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Fackenthal *et al.*, 2007; Santivasi *et al.*, 2015) Essas proteínas são capazes de ativar a quinase N-terminal c-Jun/ proteína quinase ativada por estresse (JNK/ SPK) que é responsável pelo desenvolvimento da apoptose (Fackenthal *et al.*, 2007; Santivasi *et al.*, 2015; Khodabandehlou *et al.*, 2019).

Ademais, já foi relatado que E7 consegue inibir os inibidores de quinases dependes de ciclina, como o inibidor de quinase dependente de ciclina, WAF1, e a proteína semelhante a cinesina, KIP1, permitindo a manutenção do ciclo celular (Yim *et al.*, 2005; Khodabandehlou *et al.*, 2019). Foi demonstrado também que a inflamação crônica, mediada por diversas citocinas, pode aumentar a progressão tumoral por meio da supressão da atividade antitumoral, promovendo então, o desenvolvimento

de metástases (Stone *et al.*, 2014; Esquivel-Velázquez *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2015).

A sinalização da via da STAT-3, responsável por promover a sobrevivência celular, progressão tumoral, metástase e invasão, também pode estar relacionada com o desenvolvimento do câncer de mama em pacientes HPV-positivos (Zhang *et al.*, 2016). A oncoproteína E6 induz a expressão da citocina inflamatória IL-6 que induz a fosforilação autócrina e parácrina da STAT3 responsável por ativá-la (Morgan; Macdonald, 2019b). Ao final da via, ocorre a liberação de várias citocinas pró-inflamatórias que desempenha um papel antitumoral, como por exemplo a IL-17, que pode retroalimentar positivamente a via de sinalização da STAT-3, induzindo mais expressão de IL-17 (Chen *et al.*, 2011; Mukherjee *et al.*, 2012; Gagliani *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

Estudos suspeitam também que a oncoproteína E6 do HPV consegue regular positivamente a expressão da Ciclooxygenase- 2 (COX-2) que está relacionada com a proliferação, angiogênese, invasividade, metástase, inibição da apoptose e imunovigilância nos mais diversos cânceres, inclusive o de mama. (Wang *et al.*, 2017b). A E6 poderá degradar a proteína NFX1, regulando negativamente a p105 e estabilizando a NFkB que pode ativar a transcrição da COX-2 (Islam *et al.*, 2020).

O aumento da expressão, pela proteína E6, de Id-1 no câncer de mama invasivo também tem sido estudado no contexto do câncer de mama (Akil *et al.*, 2008). O gene Id-1 possui várias funções, como metástase, angiogênese e indução da proliferação celular, estando fortemente correlacionado com diversas vias, como EGFR, PI3K/AKT, STAT3 (Zhao *et al.*, 2020). Estudos mostram que ele pode estar relacionado com a ativação da via PI3K/AKT e ser um mediador da via do EGFR, vias que estão envolvidas na proliferação celular e na angiogênese, respectivamente (Zhao *et al.*, 2020).

Estudos sugerem também que a oncoproteína E6 possa interagir com o receptor HER2 promovendo a migração celular (Islam *et al.*, 2020). A ativação de HER2 leva a ativação de c-SCR que leva a fosforilação da β -catenina em sua extremidade C-terminal, permitindo a sua migração para o núcleo para a ativação de diversos genes envolvidos na proliferação celular, podendo então gerar o desenvolvimento de neoplasias mamárias (Islam *et al.*, 2020).

O HPV é capaz de inativar os genes supressores de tumor p53 e pRB (Howley *et al.*, 1989). A p53 pode reprimir a transcrição da proteína antiapoptótica BCL2 e

promover a expressão de p21, uma proteína da família dos inibidores de ciclina (Ambrosini *et al.*, 1997). Ademais, o HPV pode também desregular o gene da survinina que possui também um papel antiapoptótico (Wang *et al.*, 2017c). Embora estudos já tenham mostrado uma associação desses genes em lesões malignas do câncer cervical, alguns estudos já mostram que esses genes possam estar envolvidos também na carcinogênese mamária induzida pelo HPV (Wang *et al.*, 2017c).

A superexpressão da proteína APOBEC3B (A3B), responsável por causar alterações no DNA para evitar a infecção viral, podendo então causar mutações excessivas e ciclo celular desregulado, foi observada nos cânceres de cabeça e pescoço HPV-positivos e nos cânceres de colo de útero (Kenji Ohba *et al.*, 2014; Warren *et al.*, 2017). Alguns estudos preliminares já mostram que a proteína A3B possa estar superexpressa também nos cânceres de mama HPV-positivos, sendo a sua superexpressão podendo ser induzida pelas oncoproteínas do HPV (Kenji Ohba *et al.*, 2014). Diante do exposto, o HPV parece modular diferentes condições durante a carcinogênese mamária, entretanto, mais estudos acerca do processo de desenvolvimento desse câncer em pacientes HPV-positivos são necessários para esclarecer a associação das oncoproteínas virais com as neoplasias mamárias.

2.3 Métodos de detecção e expressão do HPV

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica comumente utilizada para detecção de pequenas quantidades de DNA (Zhang *et al.*, 2019). Atualmente, é o método mais utilizado para detecção de HPV, em especial, a modalidade de Nested PCR, utilizando o conjunto de *primers* MY/GP (Fuessel Haws *et al.*, 2004). Esses *primers* possuem a região conservada L1 do HPV como alvo, permitindo que vários tipos de HPV sejam detectados (Fuessel Haws *et al.*, 2004; Shen-Gunther; Yu, 2011). O *amplicon* gerado pelo conjunto de primers GP5/GP6 possui aproximadamente 150 pares de bases (pb), enquanto o produto gerado pelos primers MY09/MY11 possui aproximadamente 450pb (Rughooputh *et al.*, 2006). Estudos mostram que o HPV16 e HPV18 foi identificado por Nested PCR utilizando MY/GP em 81,81% e 18,19% das amostras de câncer de pulmão (De Oliveira *et al.*, 2018). Em relação ao câncer de mama, foi detectado o HPV utilizando Nested PCR em 20,3% de neoplasias mamárias malignas e 35% em tumores mamários benignos (Maldonado-Rodríguez *et al.*, 2022).

Outra variação da PCR utilizada para o diagnóstico do HPV é a PCR Multiplex, um método simples, com alta especificidade e sensibilidade para detectar genótipos do HPV e que consiste na utilização de vários primers para a amplificação de vários genes simultaneamente, economizando tempo e custo (Lin *et al.*, 2005; Tsakogiannis *et al.*, 2015; Haas *et al.*, 2016). Essa técnica permitiu a identificação do vírus em cerca de 90 amostras de cervical, onde 52 amostras foram detectadas com HPV, das quais 57,8% foram detectadas infecções por um tipo de HPV, 25,6% foram detectadas infecções por dois tipos de HPV, 13,3% por três tipos e 3,3% por quatro tipos de HPV (Tsakogiannis *et al.*, 2014). A utilização da PCR Multiplex na modalidade tempo real (qPCR), caracterizada pela utilização de moléculas fluorescentes para monitorar a formação do amplicon durante cada ciclo de PCR, também se torna extremamente valiosa, visto que, a partir dela, pode-se quantificar a expressão gênica das principais oncoproteínas do HPV, como a E7, utilizando quantidades muito pequenas de material inicial (Scheurer *et al.*, 2007). Além disso, a facilidade do procedimento permite uma análise epidemiológica em larga escala (Navarro *et al.*, 2015).

A PCR uniplex também permite a identificação simultânea da maioria dos tipos de HPV de relevância clínica (Pizzighella *et al.*, 1995). A técnica consiste na amplificação simultânea de sequências alvos em múltiplos loci genéticos utilizando primers específicos que contém caudas universais (Lin *et al.*, 1996). Estudos demonstram que a PCR uniplex possui algumas vantagens em relação a detecção por L1 e por PCR multiplex, visto que a detecção por L1 por PCR convencional pode negligenciar algumas infecções múltiplas pelo HPV (Sasagawa *et al.*, 2001; Gravitt *et al.*, 2008). Já a PCR multiplex pode ter a sua sensibilidade comprometida quando utilizadas em condições não ideais ou quando utilizado proporções muito baixas de primers, podendo levar a resultados falsos-negativos (Markoulatos *et al.*, 2002; Clifford *et al.*, 2016). Diante disso, um estudo realizado por Okodo *et al.* (2018) conseguiu detectar, por meio da PCR uniplex E6/E7, mais tipos de HPV do que por meio de um ensaio Genoserach-31 que possui como alvo a região L1 e utiliza um sistema multiplex para a detecção do HPV.

Outro teste utilizado para a detecção do HPV é a hibridização *in situ*, um método sensível e específico para detecção de DNAs e RNAs mensageiros do HPV, permitindo o entendimento acerca da replicação viral, expressão gênica, diferenciação celular e transformação neoplásica (Stoler *et al.*, 1986). A hibridização *in situ* por RNA permite uma visualização direta do vírus ativo por meio de sondas capazes de detectar

o RNA mensageiro das oncoproteínas E6 e E7 do vírus e fornece uma localização morfológica do DNA do HPV em células neoplásicas que foram infectadas pelo vírus (Pagliusi *et al.*, 2007; Kelesidis *et al.*, 2011; Ukpo *et al.*, 2011; Bishop *et al.*, 2012; Lewis *et al.*, 2012; Venuti *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Rooper *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2018). Em um estudo envolvendo a detecção por hibridização *in situ* de RNA em lesões escamosas do tecido conjuntivo ocular, foram detectados a presença de HPV's de baixo risco em 83% dos papilomas e cerca de 7% de HPV's de alto risco foi detectado nos papilomas (Peterson *et al.*, 2022).

Apesar da utilização das técnicas moleculares supracitadas, testes como o esfregaço citológico corado com Papanicolau ainda têm sido bastante utilizado para a detecção de diversas neoplasias cervicais de estágios I, II e III, mesmo que apresente uma menor sensibilidade para a detecção de neoplasias cervicais pré-cancerígenas (Tsakogiannis *et al.*, 2015). Estudos demonstram que o esfregaço citológico corado com Papanicolau apresenta uma maior sensibilidade e especificidade para lesões do tipo HSIL e lesões glandulares, em comparação com os testes de DNA do HPV que podem ser utilizados também para a detecção do vírus (Kang *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar a presença do HPV e analisar a expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 do vírus nos tecidos mamários de mulheres com neoplasias mamárias.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a detecção do HPV em tecidos mamários parafinados por meio de PCR convencional.
- Identificar quais classificações das neoplasias mamárias estão mais presentes na infecção pelo HPV.
- Analisar a expressão das oncoproteínas E5, E6 e E7 em tecidos parafinados de mama.
- Identificar o melhor método de detecção do HPV no câncer de mama.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas foram coletadas no período de junho de 2019 a dezembro de 2023, por meio de *core* biópsias de pacientes com câncer de mama que estão sendo tratados no Hospital das Clínicas (HC-UFPE), Recife, Pernambuco. No total, obtiveram-se 92 amostras. Além da idade, o tipo citopatológico, tipo tumoral e metástase foi avaliado para uma melhor caracterização da população estudada. Após a coleta, as amostras foram submetidas a um processo de parafinização e encaminhadas para o Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) para serem utilizadas no projeto. Para a realização do estudo, os pacientes foram submetidos em dois grupos distintos após a detecção do HPV nos tecidos parafinados de câncer de mama. O grupo 1 é composto por pacientes com câncer de mama e HPV (grupo tratamento) e o grupo 2 é composto por pacientes com câncer de mama e sem HPV (grupo controle). A classificação histológica do tecido mamário utilizado para a realização deste projeto de pesquisa está de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, sob o número CAAE 40062720.0.0000.5208.

3.2 Extração de DNA e detecção de HPVs de alto risco em tecidos tumorais de mama

As amostras de blocos parafinados de tecido de mama dos pacientes com câncer de mama foram cortadas em uma espessura de 10 a 15 microns. Após os cortes, foram pesadas 50 a 100mg de tecido. Logo em seguida, foi adicionado 1ml de Trizol e homogeneizado utilizando o vórtex. As amostras foram incubadas no Trizol por cerca de 5 a 10 minutos em temperatura ambiente para permitir a quebra da membrana celular. Foi adicionado 0,2ml de Clorofórmio e, em seguida, misturado vigorosamente no vórtex. As amostras foram incubadas por 2 a 3 minutos na temperatura ambiente e depois centrifugadas a alta velocidade por cerca de 20 minutos para a separação das fases aquosa (contendo o DNA) e orgânica (contendo restos celulares). A fase aquosa foi transferida e foi adicionado 1ml de álcool isopropílico gelado. Após isso, as amostras foram incubadas no -80°C por 20 minutos

para precipitação total do DNA. Passados os 20 minutos, as amostras foram centrifugadas em alta velocidade para precipitação do DNA (*pellet*) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi purificado utilizando álcool etílico a 70% e centrifugado por 10 minutos. Após a centrifugação, o álcool foi removido e o *pellet* passou pelo processo de secagem a temperatura ambiente por 30 minutos. Após isso, o pellet foi ressuscitado em 30 microlitros de água Nuclease-free e foi adicionado 1,0 microlitro de RNase para garantir que apenas DNA estaria presente e, logo em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C para atividade da RNase. O DNA extraído foi quantificado utilizando o Nanodrop e foram consideradas apenas amostras que apresentarem valores maiores do que 50ng/ul e razões 260/280 entre 1,8 e 2,2.

A detecção do HPV foi realizada a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando dois pares de primers para a região L1 (MY09 – CGTCCMARRGGAWACTGATC e MY011 - GCMCAGGGWCATAAYAATGG; GP5 - TTTGTTACTGTGGTAGATAC e GP6 - GAAAATAAACTGTAAATCA. Foi utilizado o FIREPol® Master Mix 12.5Mm MgCl₂ 5X da Solis Biodyne para a realização da PCR. Além disso, foram utilizadas DNA da célula C3, uma célula infectada com DNA do HPV16, como controle positivo da reação de PCR e Master Mix como controle negativo da reação. As condições da PCR para a amplificação dos genes alvo MY consistiu em uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e meio, e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. Já para o gene alvo GP consistiu em uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 minutos seguida por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e meio, e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados de MY e GP apresentavam aproximadamente 450pb e 140pb, respectivamente, e foram observados em um gel de agarose a 2% corados com brometo de etídio. Para a identificação do tamanho das bandas geradas, foi utilizado o marcador 50pb DNA Step Ladder da Promega Corporation.

3.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras de blocos parafinados de tecido de mama dos pacientes com câncer de mama foram cortadas em uma espessura de 10 a 15 microns. Após os

cortes, foram pesadas 100 a 150mg de tecido. Logo em seguida, foi adicionado 1ml de Trizol e homogeneizado utilizando o vórtex. As amostras foram incubadas no Trizol por cerca de 5 a 10 minutos na temperatura ambiente para permitir a quebra da membrana celular. Foi adicionado 0,2ml de Clorofórmio e agitou-se vigorosamente no vórtex. As amostras foram incubadas por 2 a 3 minutos na temperatura ambiente e depois centrifugadas a alta velocidade por cerca de 20 minutos para a separação das fases aquosa (contendo o RNA) e orgânica (contendo restos celulares). A fase aquosa foi transferida e foi adicionado 1ml de álcool isopropílico gelado. Após isso, as amostras foram incubadas no -80°C por 20 minutos para precipitação total do RNA. Passados os 20 minutos, as amostras foram centrifugadas em alta velocidade para precipitação do RNA (pellet) e o sobrenadante foi descartado. O pellet restante foi purificado utilizando álcool etílico a 75% e centrifugado por 10 minutos. Após a centrifugação, o álcool foi removido e colocou-se o pellet de RNA para secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Após isso, o pellet foi ressuscitado em água Nuclease-free e foi adicionado 10 microlitos de DNase para garantir a pureza do RNA. Logo em seguida, as amostras foram incubadas por 15 minutos a 60°C utilizando um termobloco. O RNA extraído foi quantificado utilizando um Nanodrop e foram consideradas apenas amostras que apresentarem valores maiores do que 125 ng/ul e razões 260/280 próximas a 2,0. Após a extração, os RNAs extraídos foram convertidos em cDNA, utilizando o kit da Applied Biosystems High Capacity cDNA reverse transcription kit, para amplificação em tempo real e análise dos oncogenes E5, E6 e E7 do HPV.

3.4 Análise de expressão relativa via RT-qPCR

A amplificação dos oncogenes E5, E6 e E7 foi realizada em placas de 96 poços, utilizando os seguintes pares de *primers*: E5 F- ACAACATTACTGGCGTGCT, E5 R – GAGGCTGCTGTTATCCACAATA; E6 F -TCAGGACCCACAGGAGCG E6 R – CCTCACGTCGCAGTAACTGTTG; E7 F- CCGGACAGAGCCCATTACAA; E7 R – CGAATGTCTACGTGTGTGCTTTG). Foi realizada uma amplificação prévia por PCR convencional devido para garantir a amplificação adequada em tecidos parafinados que sofrem degradação durante o processo de parafinização (Vermeulen *et al.*, 2009; Korenková *et al.*, 2015). As reações de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) foram conduzidas no termociclador BioRad pelo método SYBR Green, que consiste

na visualização da amplificação dos genes selecionados utilizando um intercalante de DNA de fita dupla, utilizando as recomendações do MIQE (Bustin; Wittwer 2017). As amostras foram realizadas em duplicatas técnicas e os genes de referência GAPDH (F- GAGTGGGGTGGCAGGTATT; R – TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG) e EEF1A1 (F- GTTGCGGTGGGTGTCATCA; R – GAGTGGGGTGGCAGGTATT) foram utilizados como controle interno para normalizar as reações de RT-qPCR, visto que suas expressões já foram testadas anteriormente em estudos que envolviam amostras de câncer de mama (Nascimento *et al.*, 2024). Além disso, curvas de dissociação foram realizadas para verificar a especificidade da amplificação, assegurando que apenas o gene-alvo foi amplificado. Uma amostra previamente testada e validada foi utilizada como controle positivo da reação e Mix com água nuclease-free foi utilizado como controle negativo.

3.5 Análises estatísticas

As características dos pacientes como, idade, metástase, tipo citopatológico e tipo tumoral foram avaliadas utilizando o teste exato de Fisher. A distribuição dos dados foi verificada quanto a normalidade e testes paramétricos foram utilizados em amostras que se apresentaram em distribuição normal. Para as amostras que não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma versão 9.0.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização geral das pacientes e dos tumores mamários

Foi realizada uma análise com 92 pacientes para investigar a presença do HPV em tecidos mamários. Das 92 pacientes analisadas, 41 apresentaram idade de 29-59 anos (44,56%) e 51 pacientes apresentaram idade de 60-85 anos (55,44%). Dentre as 92, 35 (38,04%) pacientes apresentaram metástase, 37 (40,22%) pacientes não apresentaram metástase e 20 (21,74%) pacientes não foram identificados com

relação a presença ou não de metástase. Com base na classificação de Yokohama, foram identificadas 14 (15,22%) pacientes com o tipo citopatológico C4 (suspeito para malignidade) e 78 (84,78%) pacientes com o tipo citopatológico C5 (maligno). Com relação ao tipo tumoral, 10 (10,87%) pacientes foram caracterizados como HER2 positivo, 47 (51,09%) pacientes foram caracterizadas como Luminal A, 30 (32,61%) pacientes como Luminal B e 5 pacientes (5,43%) como Triplo-negativo.

Características	Pacientes (nº)	Percentual (%)
Idade		
29-59 anos	41	44,56
60-85 anos	51	55,44
Metástase		
Presença de metástase	35	38,04
Ausência de metástase	37	40,22
Não identificado	20	21,74
Classificação Citopatológica (Yokohama)		
C4 (Suspeito para malignidade)	14	15,22
C5 (Maligno)	78	84,78
Tipo Tumoral		
HER2 positivo	10	10,87
Luminal A	47	51,09
Luminal B	30	32,61
Triplo-negativo	5	5,43

Figura 4: Caracterização geral das pacientes e dos tumores mamários. Fonte: O autor (2024).

4.2 Detecção por MY e GP e análise da expressão dos oncogenes do HPV em pacientes com câncer de mama

Das 92 pacientes, a presença do DNA do HPV foi detectada em 43 amostras de tecido parafinado (Figura 5). Após a análise da detecção de MY e GP, no qual, inicialmente, 20 pacientes se apresentaram positivos para MY e GP e 23 pacientes positivaram para a presença do HPV após a realização da Nested-PCR utilizado um par de *primers* específico para GP, as amostras das 92 pacientes foram submetidas a extração de RNA e conseqüente avaliação da expressão dos oncogenes E5, E6 e E7. Das 92 amostras submetidas para a avaliação da expressão dos oncogenes do

HPV, apenas 50 amostras apresentaram quantificações acima de 125ng/ul e razões 260/280 e 260/230 entre 1,8 e 2,0 e foram consideradas nessa etapa do estudo.

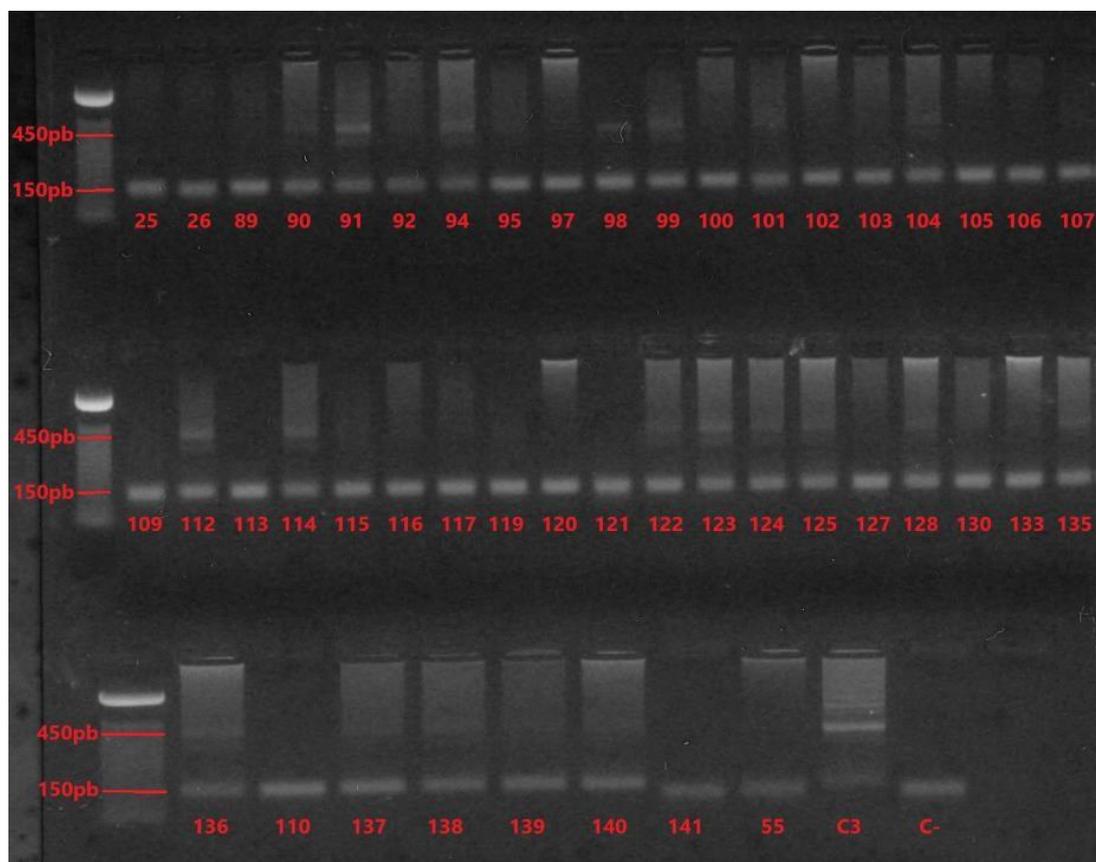


Figura 5: Detecção do HPV por MY e GP utilizando gel de agarose a 2%. Fonte: O autor (2024).

A presença dos oncogenes virais foi avaliada nas 50 amostras que foram divididas em 2 grupos distintos: O grupo 1 referente as amostras positivas para MY e GP e o grupo 2 referente as amostras negativas para MY e GP. Das 50 amostras, 17 foram positivas para MY e GP e 33 foram negativas para MY e GP. Das 33 amostras negativas, 20 amostras se apresentaram positivas para a expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 e 13 amostras se apresentaram negativas para a expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 do HPV. Com esse método de detecção, o número de amostras positivas para HPV subiu para 37 e o número de amostras negativas para HPV caiu para 17 amostras. Ademais, foi detectado um aumento significativo, nas amostras positivas para o HPV, da expressão relativa dos níveis da oncoproteína E5 quando comparada com as oncoproteínas E6 e E7. Entretanto, não foram detectados diferença de expressão entre as oncoproteínas E6 e E7 do HPV.

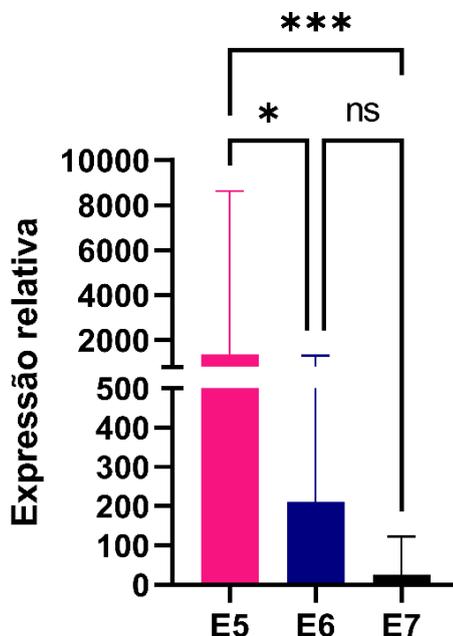


Figura 6: Expressão relativa das oncoproteínas E5, E6 e E7 nos pacientes com câncer de mama HPVs positivo. Fonte: O autor (2024).

4.3 Caracterização de pacientes positivas e negativas para HPV

Dos 92 pacientes, 43 se apresentaram como positivo para HPV e 49 foram negativos para o HPV. Das positivas, 22 pacientes (23,91%) apresentaram idade de 29-59 anos e 21 pacientes (22,83%) apresentaram idade de 60-85 anos. 18 pacientes apresentaram metástase (19,57%), 18 pacientes não apresentaram metástase (19,57%) e 7 pacientes não foram identificados com relação a presença ou não de metástase (7,61%). Analisando o tipo citopatológico nas amostras positivas para o HPV, 7 pacientes foram classificados como C4 (7,61%) e 36 pacientes foram classificados como C5 (39,13%). Já se tratando do tipo tumoral, 4 pacientes foram classificadas como HER2 positivo (4,35%), 19 pacientes como luminal A (20,65%), 18 pacientes como luminal B (19,57%) e 2 pacientes como triplo negativo (2,17%). Quanto aos pacientes que foram HPV negativo, de um total de 49 pacientes, 20 se apresentaram com idade de 29-59 anos (21,74%) e 29 com idade que varia de 60-85 anos (31,52%). 18 pacientes apresentaram metástase (19,57%), 20 pacientes não

foram identificados com metástase (21,74%) e 11 pacientes não foram identificados com relação a presença ou não de metástase (11,96%). Para o tipo citopatológico, 7 pacientes foram classificadas como C4 (7,61%) e 42 pacientes como C5 (45,65%). Com relação ao tipo tumoral, 6 pacientes foram HER2 positivos (6,52%), 27 pacientes foram Luminal A (29,35%), 12 pacientes Luminal B (13,04%) e 4 pacientes foram classificadas como Triplo negativo (4,35%). Com base nos dados de idade (Odds Ratio = 0,6885 e $p = 0,4023$), metástase (Odds Ratio = 0,6054 e $p = 0,7388$), tipo molecular ($p = 0,3503$) e tipo citopatológico (Odds Ratio = 0,3997 e $p > 0,9999$), não foram encontradas nenhuma associação estatística significativa entre os grupos HPV positivos e negativos.

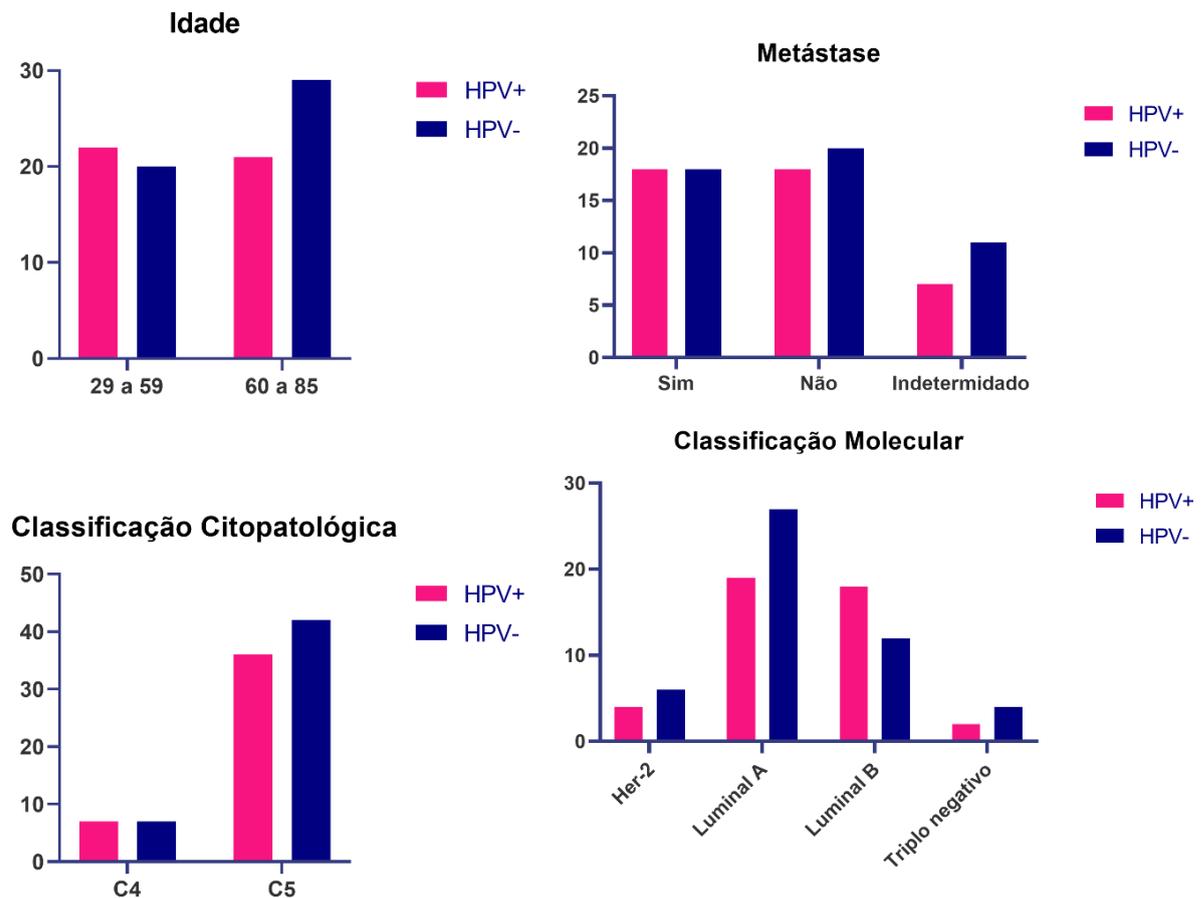


Figura 7: Caracterização das pacientes positivas e negativas para HPV. Idades das pacientes HPV+ e HPV- (A). Detecção de metástases nos grupos HPV+ e HPV- (B). Classificação citopatológica dos grupos HPV+ e HPV- (C). Classificação molecular dos grupos HPV+ e HPV- (D). Fonte: O autor (2024).

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama é considerado mundialmente como um dos cânceres mais prevalentes e que mais matam pacientes do sexo feminino (Golrokh Mofrad *et al.*, 2021; Maldonado-Rodríguez *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022). Atualmente, uma série de fatores genéticos e ambientais vem sendo associados com o desenvolvimento do câncer de mama (Gupta *et al.*, 2021; Alinezhadi *et al.*, 2022). Entretanto, estudos demonstram também que o avanço da idade biológica, medida por modificações epigenéticas, está associada a um aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama (Srikant Ambatipudi *et al.*, 2017; Hofstatter *et al.*, 2018; Kresovich *et al.*, 2023). O envelhecimento está associado a mudanças no tecido mamário que pode ocasionar o desenvolvimento do câncer, tais como a perda da função supressora do tumor e alterações no microambiente mamário (Labarge *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020). Em nosso estudo, 51 mulheres apresentaram câncer de mama com idade variando de 60-85 anos e 41 mulheres apresentaram câncer de mama com idade variando de 29-59 anos o que corrobora com os achados citados, e alerta para uma aproximação entre os casos de mulheres com idade mais e menos avançadas. Em adicional, ao observar a presença de metástase, de um total de 92 mulheres, 37 não apresentaram metástase e 35 apresentaram. Considerando que nosso estudo é composto por uma maior quantidade amostral de mulheres com idade avançada, o número de pacientes com metástase reforça o desenvolvimento e a gravidade desse câncer mesmo em mulheres mais jovens. O número de metástase em cânceres de mama HPV-positivos pode ter sido influenciado pelas alterações que o HPV pode causar em genes como, COX-2 e STAT3 que estão relacionados com metástase, invasão e progressão tumoral (Zhang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017b), assim, a investigação dos perfis transcricionais desses genes podem contribuir com o esclarecimento da relação entre o câncer de mama metastático e o HPV.

Além dos fatores genéticos, ambientais e do envelhecimento, vírus como, Epstein-Barr, citomegalovírus, herpes-simplex-1 e o HPV vem sendo considerados como possíveis causadores do desenvolvimento do câncer de mama (Schiffman *et al.*, 2007; Herrera-Goepfert *et al.*, 2011; Petry *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2016; Kazemi Aghdam *et al.*, 2019). O HPV, por ser um vírus carcinogênico e sexualmente transmissível, pode ser mais facilmente encontrado em mulheres jovens que possuem

sua vida sexual ativa (Pandey *et al.*, 2019). Logo, é provável que os cânceres de mama HPV-positivos sejam mais comuns em mulheres mais jovens do que o câncer de mama HPV-negativo (Lawson *et al.*, 2006). Em nosso estudo, foi observado que mulheres com idade de 29 a 35 anos foram mais associadas ao câncer de mama HPV-positivo e mulheres com idade mais avançada de 60 a 85 anos foram mais associadas ao desenvolvimento do câncer de mama HPV – negativo, indicando que talvez o vírus possa estar aumentando o desenvolvimento desse tipo de câncer em pacientes mais jovens.

De acordo com a classificação molecular, foi observado que 27 mulheres HPV-negativas apresentaram a classificação molecular do câncer de mama como Luminal A e 19 mulheres HPV-positivas apresentaram essa mesma classificação, totalizando 46 amostras (50% do total amostral). A grande quantidade de mulheres HPV-negativas apresentando a classificação molecular Luminal A reflete o fato dessa classificação ser a mais comum encontrada nos cânceres de mama, representando cerca de 37,19% de todos os carcinomas mamários (Khelf *et al.*, 2020). Nas mulheres que foram HPV-positivas o tipo molecular Luminal A também foi predominante, seguido de Luminal B, HER2 e triplo negativo. Contudo, considerando o câncer de mama em pacientes infectadas pelo HPV, na literatura é frequentemente observado um aumento, na presença do HPV, de tumores triplo-negativos e positivos para HER2, que têm um prognóstico mais desfavorável em comparação aos tumores Luminal A e Luminal B (Piana *et al.*, 2014; Balci *et al.*, 2019; De Carolis *et al.*, 2019). A divergência de resultados pode ter ocorrido devido ao perfil da população estudada, que se restringiu a população do Estado de Pernambuco, que possui os tipos Luminal A e B como os mais prevalentes da região (Souza *et al.*, 2019). Entretanto, apesar da ocorrência de cânceres do tipo Luminal A e B serem considerados menos metastáticos, 18 pacientes positivas para o HPV (41,86%) apresentaram metástase (Van Maaren *et al.*, 2018). Quanto a classificação citopatológica, 42 pacientes apresentaram classificação C5 (maligno) e apenas 7 pacientes apresentaram classificação C4 (suspeito para malignidade). Esses dados corroboram com os dados apresentados na literatura que sugerem que a presença do HPV, principalmente do HPV-16 e 18, pode estar mais relacionado ao desenvolvimento de fenótipos malignos (Pires *et al.*, 2004).

Com relação a detecção do HPV por meio das regiões MY e GP que compõem a proteína L1 do capsídeo viral, nosso estudo demonstrou que, inicialmente, apenas

20 amostras foram detectadas utilizando o primer MY. Em seguida, após a realização da nested-PCR, utilizando o primer GP, conseguimos encontrar mais 23 pacientes positivos para o HPV. O aumento do número de pacientes HPV positivos após a realização da nested PCR pode ter ocorrido devido à baixa carga viral encontrada nesses tipos de tecidos, além da utilização de tecidos parafinados que fornece um DNA com uma qualidade menor, dificultando na detecção do HPV (Bozic *et al.*, 2020; Maldonado-Rodriguez *et al.*, 2022). Todavia, estudos demonstram que o HPV no tecido mamário pode ser encontrado, principalmente, na sua forma integrada, com uma variação de detecção de 86% a 100% (Khan *et al.*; 2008; Islam *et al.*, 2020). Na sua forma integrada, o HPV pode passar por um processo de perda de parte da região L1, impossibilitando a detecção do HPV por meio de MY e GP (Schlecht *et al.*, 2011; Boada *et al.*, 2023). Diante disso, a detecção por meio da análise da expressão da oncoproteínas podem se tornar preferíveis para a detecção do HPV (Morris *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, das 92 amostras avaliadas quando a presença de DNA do HPV, conseguimos extrair RNA de qualidade de 50 amostras que foram submetidas para análise da expressão dos oncogenes E5, E6 e E7. Inicialmente, dessas 50 amostras, 17 haviam positivado para MY e GP e 33 haviam negativado. Contudo, após a análise da expressão, o número de amostras HPV positivas aumentou substancialmente, enquanto o número de amostras HPV negativas diminuiu. Apesar do número amostral ter sido considerado menor para análise da expressão dos oncogenes do HPV em comparação com o utilizado para a detecção do HPV por MY e GP, nosso estudo mostrou que a detecção por meio da expressão das oncoproteínas do HPV se tornou mais eficaz do que a detecção por meio do MY e GP. Entretanto, estudos mais aprofundados que envolvam um aumento do número amostral são necessários para confirmar a melhor sensibilidade da detecção do HPV no câncer de mama por meio da expressão dos oncogenes do HPV.

A avaliação da expressão relativa dos oncogenes do HPV também revelou níveis significativos aumentados da oncoproteína E5 em comparação com as oncoproteínas E6 e E7. A oncoproteína E5 é capaz de estimular vias de sinalização EGFR que estão envolvidas no crescimento e proliferação celular, além de estar relacionado com a regulação negativa do MHC-1, induzindo a evasão do sistema imunológico (Campo *et al.*, 2010; Basto *et al.*, 2019; Basukala; Banks, 2021). Já as proteínas E6 e E7 são capazes de interagir com o gene-1 e 2 de susceptibilidade ao

câncer de mama e ovário (BRCA1 e BRCA2) antagonizando diversas funções dessas proteínas que são importantes na prevenção do desenvolvimento do tumor ao repararem danos ao DNA (Rosen *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Fackenthal *et al.*, 2007; Santivasi *et al.*, 2015). No geral, muitos estudos relacionados a carcinogênese associada ao HPV realizam análises envolvendo as proteínas E6 e E7 (Yasmeen *et al.*, 2007; Islam *et al.*, 2017; Salman *et al.*, 2017). Entretanto, no câncer de mama, a alta expressão da oncoproteína E5, envolvendo baixas expressões de E6 e E7, possa estar relacionada com o desenvolvimento da carcinogênese mamária, visto que alguns estudos falharam ao tentar detectar as atividades das oncoproteínas E6 e E7, enquanto outros detectaram uma baixa expressão em cânceres de mama HPV-positivos (Nascimento *et al.*, 2024).

Apesar da análise da expressão relativa do HPV ser considerada mais vantajosa em nosso estudo por possibilitar uma detecção mais sensível e uma análise da atividade viral, a detecção pelas proteínas MY e GP, a nível de diagnóstico, no câncer de mama, ainda é considerado mais vantajoso, principalmente, devido ao menor custo de se realizar uma PCR convencional quando comparada à RT-qPCR. Entretanto, a nível de pesquisa, o presente estudo sugere que o uso da RT-qPCR pode ser mais interessante por possibilitar além de uma detecção mais sensível do HPV, uma análise abrangente acerca da atividade dos oncogenes do HPV no desenvolvimento do câncer. Além disso, a análise por RT-qPCR pode ser utilizada futuramente para entender os mecanismos que as oncoproteínas estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama, principalmente E5 que se mostrou mais aumentada nesse estudo.

6 CONCLUSÃO

Em nosso estudo, foi detectada a presença do DNA do HPV em 43 de 92 amostras de tecido mamário e expressão de RNAm dos oncogenes E5, E6 e E7 em 37 de 50 amostras. Neste sentido, a detecção da expressão dos oncogenes mostrou ser um método mais acurado para estimar a presença do HPV em relação ao método padrão de detecção por PCR convencional utilização primers MY e GP, sendo indicado para a detecção direcionada a pesquisas epidemiológicas sobre a presença do vírus no tecido mamário. Além disso, nossos estudos mostraram uma maior expressão da oncoproteína E5 quando comparada a E6 e E7, sugerindo que essa

oncoproteína e suas interações celulares podem ser alvos interessantes para auxiliar o entendimento da relação entre o câncer de mama e a infecção pelo HPV.

REFERÊNCIAS

ACCARDI, R et al. E6 and E7 from human papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1. **J Virol**, v. 85, p. 8208–8216, 2011.

ADEY, NB et al. Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding. **Cancer Res**, v. 60, p. 35–37, 2000.

AKAGI, K. et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. **Genome Research**, v. 24, p. 185–199, 2013.

AKIL, N. et al. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 3, p. 404–407, 22 jul. 2008.

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

AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D. C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nature Medicine**, v. 3, n. 8, p. 917–921, ago. 1997.

ANNA SZYMONOWICZ, K.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer biology & medicine*, v. 17, n. 4, p. 864–878, 2020

ARIAS-PULIDO, H. et al. Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1755–1762, 2006.

ASHRAFI, G. H.; HAGHSHENAS, M. R.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P. M.; CAMPO, M. S. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal of Cancer**, v. 113, p. 276–283, 2005.

ASHRAFI, G. H.; HAGHSHENAS, M.; MARCHETTI, B.; CAMPO, M. S. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. **International Journal of Cancer**, v. 119, p. 2105–2112, 2006.

AYDIN, I. et al. Large scale RNAi reveals the requirement of nuclear envelope breakdown for nuclear import of human papillomaviruses. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1004162, 2014.

AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. E. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Revista de saúde pública**, v. 44, n. 5, p. 963–974, 2010.

BADAL, S. et al. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. **Virology**, v. 324, p. 483–492, 2004.

BAE, J.-M.; KIM, E. H. Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: a meta-analysis of case-control studies. **Infectious Agents and Cancer**, v. 11, n. 1, 14 mar. 2016.

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

BASTO, D.L. et al. The papillomavirus *E5* gene does not affect *EGFR* transcription and overall survival in cervical cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 8, p. 1283–1289, 18 nov. 2019.

BASUKALA, O.; BANKS, L. The Not-So-Good, the Bad and the Ugly: HPV E5, E6 and E7 Oncoproteins in the Orchestration of Carcinogenesis. **Viruses**, v. 13, n. 10, p. 1892, 22 set. 2021.

BECKER, K. A.; FLORIN, L.; SAPP, C.; SAAP, M. Dissection of human papillomavirus type 33 L2 domains involved in nuclear domains (ND) 10 homing and reorganization. **Virology**, v. 314, p. 161–167, 2003.

BERGOT, AS et al. Hpv16-E7 expression in squamous epithelium creates a local immune suppressive environment via CCL2- and CCL5- mediated recruitment of mast cells. **PLoS Pathog**, v. 10, p. e1004466, 2014.

BESTER, A. C. et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 435–446, 2011.

BEYER-FINKLER, E.; STOLER, M. H.; GIRARDI, F.; PFISTER, H. J. Cell differentiation-related gene expression of human papillomavirus 33. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 179, p. 185–192, 1990.

BIENKOWSKA-HABA, M.; PATEL, H. D.; SAPP, M. Target cell cyclophilins facilitate infection by human papillomavirus type 16. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000524, 2009.

BISHOP, J. A. et al. Detection of Transcriptionally Active High-risk HPV in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma as Visualized by a Novel E6/E7 mRNA In Situ Hybridization Method. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 12, p. 1874–1882, 1 dez. 2012.

BLANCO, R. et al. Human Papillomavirus in Breast Carcinogenesis: A Passenger, a Cofactor, or a Causal Agent? **Biology**, v. 10, n. 8, p. 804, 20 ago. 2021.

BOADA, E. Agreement between L1 and E6/E7-based assays for detection of high-risk HPV in cervical, oropharyngeal and penile cancers. **Journal of Clinical Pathology**, v. 76, p. 467–473, 2023.

BODAGHI, S. et al. Could Human Papillomaviruses Be Spread through Blood? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5428–5434, 1 nov. 2005.

BODELON, C. et al. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. **International Journal of Cancer**, v. 139, p. 2001–2011, 2016.

BODILY, J. M.; MEYERS, C. Genetic Analysis of the Human Papillomavirus Type 31 Differentiation-Dependent Late Promoter. **Journal of Virology**, v. 79, n. 6, p. 3309–3321, 15 mar. 2005.

BOŽIĆ, L. et al. Comparison of HPV detection rate in formalin-fixed paraffin-embedded tissues of head and neck carcinoma using two DNA extraction kits and three

amplification methods. **European Journal of Oral Sciences**, v. 128, n. 6, p. 501–507, 17 nov. 2020.

BRAY, S.J. Notch signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, p. 722–735, 2016.

BRUNI, L. B. R. L. et al. ICO/IARC information centre on HPV and cancer (HPV information centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. **Summary Report**, v. 17, n. 6, 2019.

BRUNI, L. et al. Cervical human Papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. **The journal of infectious diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789–1799, 2010.

BRYAN, J.; BROWN, D. R. Association of the human papillomavirus type 11 E1AE4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. **Virology**, v. 277, p. 262–269, 2000.

BUCK, C. B. et al. Maturation of papillomavirus capsids. **Journal of Virology**, v. 79, p. 2839–2846, 2005.

BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24, p. S52–S61, 2006.

CAMPO, M. S.; GRAHAM, S. V.; CORTESE, M. S.; ASHRAFI, G. H.; ARAIBI, E. H. et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. **Virology**, v. 407, p. 137–142, 2010.

CAVALCANTE, J. et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. **Clinics**, v. 73, 10 out. 2018.

CHEN, J. et al. Intratumoral Expression of IL-17 and Its Prognostic Role in Gastric Adenocarcinoma Patients. **Internacional Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 53–60, 1 jan. 2011.

CICCHINI, L. et al. Suppression of antitumor immune responses by human papillomavirus through epigenetic downregulation of Cxcl14. **mBio**, v. 7, p. e00270-16, 2016.

CLIFFORD, G. M. et al. Comparison of two widely-used HPV detection and genotyping methods: gP5+/6+ PCR followed by reverse line blot hybridization and multiplex type-specific E7 PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 54, p. 2018-2031, 2016.

CLIFFORD, G. M. et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 991–998, 2005.

CONTRERAS-PAREDES, A et al. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. **Virology**, v. 383, p. 78–85, 2009.

CORTESE, M. S.; ASHRAFI, G. H.; CAMPO, M. S. All 4 di-leucine motifs in the first hydrophobic domain of the E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 are essential for surface MHC class I downregulation activity and E5 endomembrane localization. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 1675–1682, 2010.

CRICCA, M. et al. Disruption of HPV 16 E1 and E2 genes in precancerous cervical lesions. **Journal of Virological Methods**, v. 158, p. 180–183, 2009.

CULP, T. D. et al. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. **Journal of Virology**, v. 80, p. 8940–8950, 2006.

DE CAROLIS, S. et al. HPV DNA Associates With Breast Cancer Malignancy and It Is Transferred to Breast Cancer Stromal Cells by Extracellular Vesicles. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 16 set. 2019.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–15, 2012.

DE OLIVEIRA, T. H. A. et al. Presence and activity of HPV in primary lung cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2367–2376, 17 set. 2018.

DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 7, p. 453–459, 2007.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 2–13, 1 fev. 2018.

DE VILLIERS, E.-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 2–10, out. 2013.

DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, jun. 2004.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 99–114, out. 2013.

DOORBAR, J et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Rev Med Virol**, v. 25, n. Suppl 1, p. 2–23, 2015.

DOORBAR, J. et al. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p. F55–F70, nov. 2012.

DREER, M.; VAN DE POEL, S.; STUBENRAUCH, F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8AE2 protein. **Virus Research**, v. 231, p. 96–102, 2017.

DYSON, N. et al. The human papillomavirus -16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, p. 934–937, 1989.

DZIDUSZKO, A.; OZBUN, M. A. Annexin A2 and S100A10 regulate human papillomavirus type 16 entry and intracellular trafficking in human keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 87, p. 7502–7515, 2013.

EGAWA, N.; DOORBAR, J. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 119–127, mar. 2017.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M. et al. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, n. 1, p. 1–16, 1 jan. 2015.

EVANDER, M. et al. Identification of alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 71, p. 2449–2456, 1997.

FACKENTHAL, J. D.; OLOPADE, O. I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 12, p. 937–948, dez. 2007.

FERNANDES, J. V. et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). **Oncology Letters**, v. 9, n. 3, p. 1015–1026, 16 jan. 2015.

FERTEY, J. et al. Methylation of CpG 5962 in L1 of the human papillomavirus 16 genome as a potential predictive marker for viral persistence: A prospective large cohort study using cervical swab samples. **Cancer Medicine**, v. 9, p. 1058–1068, 2020.

FILIPPOVA, M et al. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. **J Biol Chem**, v. 279, p. 25729–25744, 2004.

FILIPPOVA, M et al. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. **J Biol Chem**, v. 277, p. 21730–21739, 2002.

FLORIN, L.; SAPP, C.; STREECK, R. E.; SAPP, M. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. **Journal of Virology**, v. 76, p. 10009–10014, 2002.

FRADET-TURCOTTE, A. et al. Nuclear Accumulation of the Papillomavirus E1 Helicase Blocks S-Phase Progression and Triggers an ATM-Dependent DNA Damage Response. **Journal of Virology**, v. 85, p. 8996–9012, 2011.

FUESSEL HAWS, A. L. et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5+/6+ primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, n. 1, p. 87–93, dez. 2004.

GAGLIANI, N. et al. The Fire Within: Microbes Inflamm Tumors. **Cell**, v. 157, n. 4, p. 776–783, 8 maio 2014.

GAO, G. et al. Common fragile sites (CFS) and extremely large CFS genes are targets for human papillomavirus integrations and chromosome rearrangements in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 56, p. 59–74, 2016.

GARCIA, J. A.; BEST, S. R.; ROOPER, L. M. HPV RNA in-situ hybridization as a diagnostic aid in papillary laryngeal lesions. **The Laryngoscope**, v. 130, n. 4, p. 955–960, 2020.

GARNETT, TO et al. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 13, p. 1915–1926, 2006.

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

GRAHAM, S. V. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiology**, v. 5, p. 1493–1506, 2010.

GRAHAM, SHEILA V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical science**, v. 131, n. 17, p. 2201–2221, 2017.

GRAVITT, P. E. et al. New Technologies in Cervical Cancer Screening. **Vaccine**, v. 26, p. K42–K52, ago. 2008.

GRUENER, M.; BRAVO, I. G.; MOMBURG, F.; ALONSO, A.; TOMAKIDI, P. The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression

in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. **Virology Journal**, v. 4, p. 116, 2007.

GUPTA, I. et al. Presence of high-risk HPVs, EBV, and MMTV in human triple-negative breast cancer. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 17, n. 11, p. 4457–4466, 8 out. 2021.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Prevalence of human Papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. **BioMed research international**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

HAAS, D. J.; CAROLINE, A. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 26, p. 1–15, 1 jan. 2016.

HANAHAN, D; WEINBERG, RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.

HASAN, U. A. et al. The Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. **Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 7, p. 1369–1387, 10 jun. 2013.

HATANO, T. et al. Pathogenic Role of Immune Evasion and Integration of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 891, 21 abr. 2021.

HELT, A.-M.; GALLOWAY, D. A. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 75, p. 6737–6747, 2001.

HERRERA-GOEPFERT, R. et al. High-risk human papillomavirus in mammary gland carcinomas and non-neoplastic tissues of Mexican women: No evidence supporting a cause and effect relationship. **Breast**, v. 20, n. 2, p. 184–189, 1 abr. 2011.

HODA, R. S.; BRACHTEL, E. F. International Academy of cytology Yokohama System for reporting breast fine-needle aspiration biopsy cytopathology: A review of predictive values and risks of malignancy. **Acta cytologica**, v. 63, n. 4, p. 292–301, 2019

HOFSTATTER, E. W. et al. Increased epigenetic age in normal breast tissue from luminal breast cancer patients. **Clinical epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 112, 2018.

HOWLEY, P. M. et al. Molecular mechanisms of transformation by the human papillomaviruses. **PubMed**, v. 20, p. 199–206, 1 jan. 1989.

HU, Z. et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. **Nature Genetics**, v. 47, p. 158–163, 2015.

HUSAIN, R. S. A.; RAMAKRISHNAN, V. Global variation of human Papillomavirus genotypes and selected genes involved in cervical malignancies. **Annals of global health**, v. 81, n. 5, p. 675, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao> Acesso em: 15 set de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa> Acesso em: 15 set de 2024.

ISLAM, MD. S.; CHAKRABORTY, B.; PANDA, C. K. Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 10, 1 maio 2020.

ISLAM, S. et al. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. e0172760–e0172760, 28 fev. 2017.

JACQUIN, E. et al. Methylation of human papillomavirus Type 16 CpG sites at E2-binding site 1 (E2BS1), E2BS2, and the Sp1-binding site in cervical cancer samples as determined by high-resolution melting analysis-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 3207–3215, 2013.

KABSCH, K. et al. The HPV-16 E5 Protein Inhibits TRAIL- and FasL-Mediated Apoptosis in Human Keratinocyte Raft Cultures. **Intervirology**, v. 47, n. 1, p. 48–56, 1 jan. 2004.

KADAJA, M. et al. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000397, 2009.

KALANTARI, M. et al. Conserved methylation patterns of human papillomavirus type 16 DNA in asymptomatic infection and cervical neoplasia. **Journal of Virology**, v. 78, p. 12762–12772, 2004.

KALANTARI, M. et al. Effects of cellular differentiation, chromosomal integration and 5-aza-2'-deoxycytidine treatment on human papillomavirus-16 DNA methylation in cultured cell lines. **Virology**, v. 374, p. 292–303, 2008.

KANG, M. et al. Comparison of papanicolaou smear and human papillomavirus (HPV) test as cervical screening tools: can we rely on HPV test alone as a screening method? An 11-year retrospective experience at a single institution. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, v. 54, n. 1, p. 112–118, 15 jan. 2020.

KATZENELLENBOGEN, R. Telomerase Induction in HPV Infection and Oncogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 180, 10 jul. 2017.

KAZEMI AGHDAM, M. et al. Absence of Human Papillomavirus in Benign and Malignant Breast Tissue. **Iranian Journal of Pathology**, v. 14, n. 4, p. 279–283, 22 set. 2019.

KELESIDIS, T. et al. Human Papillomavirus (HPV) Detection Using In Situ Hybridization in Histologic Samples. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 136, n. 1, p. 119–127, jul. 2011.

KELLEY, D. Z. et al. Integrated Analysis of Whole-Genome ChIP-Seq and RNA-Seq Data of Primary Head and Neck Tumor Samples Associates HPV Integration Sites with Open Chromatin Marks. **Cancer Research**, v. 77, p. 6538–6550, 2017.

KENJI OHBA et al. 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**, v. 9, n. 5, p. e97787–e97787, 23 mai. 2014.

KHAN, N. et al. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 3, p. 408–414, 22 jul. 2008.

KHELF, S. et al. Molecular Classification of Breast Cancer in the Region of Constantine: An Epidemiological Study. **Journal of Nanosciences Research & Reports**, p. 1–3, 31 mar. 2020.

KHODABANDEHLOU, N. et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 14 jan. 2019

KHOURY, J. D. et al. Landscape of DNA Virus Associations across Human Malignant Cancers: Analysis of 3775 Cases Using RNA-Seq. **Journal of Virology**, v. 87, p. 8916–8926, 2013.

KIM, K. et al. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. **Journal of Virology**, v. 77, p. 12450–12459, 2003.

KLINGELHUTZ, A. J.; FOSTER, S. A.; MCDUGALL, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 79–82, mar. 1996.

KOZAK, M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 187–208, jul. 1999.

KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, v. 44, n. 2, p. 283–292, jan. 1986.

KRESOVICH, J. K. et al. Methylation-Based Biological Age and Breast Cancer Risk. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 10, p. 1051–1058, 22 fev. 2019.

KUDELA, E. et al. HPV-associated breast cancer: Myth or fact? **Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1510, 2022.

LABARGE, M. A. et al. Breast Cancer beyond the Age of Mutation. **Gerontology**, v. 62, n. 4, p. 434–442, 6 nov. 2015.

LAU, L et al. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. **Science**, v. 350, p. 568–571, 2015.

LAW, ANDREW MK; VALDES-MORA, F; GALLEGO-ORTEGA, DAVID. Myeloid-derived suppressor cells as a therapeutic target for cancer. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 561, 2020.

LAWSON, J. S. et al. Are some breast cancers sexually transmitted? **British Journal of Cancer**, v. 95, n. 12, p. 1708–1708, 28 nov. 2006.

LEWIS JR, J. S. et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas - a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. **Histopathology**, v. 60, n. 6, p. 982–991, 23 fev. 2012.

LI, C. M.-C. et al. Aging-Associated Alterations in Mammary Epithelia and Stroma Revealed by Single-Cell RNA Sequencing. **Cell Reports**, v. 33, n. 13, p. 108566, dez. 2020.

LI, N. et al. Structure of the origin recognition complex bound to DNA replication origin. **Nature**, v. 559, n. 7713, p. 217–222, 2018.

LIFFORD, G. M.; TULLY, S.; FRANCESCHI, S. Carcinogenicity of human Papillomavirus (HPV) types in HIV-positive women: A meta-analysis from HPV infection to cervical cancer. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 9, p. 1228–1235, 2017.

LIN, F.-M. et al. Primer design for multiplex PCR using a genetic algorithm. **CiteSeer X (The Pennsylvania State University)**, p. 475–476, 25 jun. 2005.

LIN, Z.; CUI, X.; LI, H. Multiplex genotype determination at a large number of gene loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2582–2587, 19 mar. 1996.

LIU, Z.; RASHID, T.; NYITRAY, A. G. Penises not required: a systematic review of the potential for human papillomavirus horizontal transmission that is non-sexual or does not include penile penetration. **Sexual Health**, v. 13, n. 1, p. 10, 2016.

ŁUKASIEWICZ, S. et al. Breast cancer—epidemiology, Risk factors, classification, Prognostic markers, and Current Treatment Strategies—an Updated Review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021.

MALDONADO-RODRÍGUEZ, E. et al. Presence of human Papillomavirus DNA in malignant neoplasia and non-malignant breast disease. **Current issues in molecular biology**, v. 44, n. 8, p. 3648–3665, 2022.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p. 47–51, 2002.

MARTINEZ-ZAPIEN, S. et al. Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. **Nature**, v. 529, p. 541–545, 2016.

MCBRIDE, A. A. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. *Nature reviews*. **Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 95–108, 2022.

MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. **Virology**, v. 445, p. 57–79, 2013.

MCBRIDE, A. A.; OLIVEIRA, J. G.; MCPHILLIPS, M. G. Partitioning viral genomes in mitosis: Same idea, different targets. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 5, n. 14, p. 1499–1502, 2006.

MCINTOSH, P. B. et al. E1^{E4}-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation: a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. **Journal of cell science**, v. 123, n. 16, p. 2810–2822, 2010.

MIURA, S.; KAWANA, K.; SCHUST, D. J.; FUJII, T.; YOKOYAMA, T. et al. CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. **Journal of Virology**, v. 84, p. 11614–11623, 2010.

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

MORGAN, E. L.; MACDONALD, A. JAK2 Inhibition Impairs Proliferation and Sensitises Cervical Cancer Cells to Cisplatin-Induced Cell Death. **Cancers**, v. 11, n. 12, p. 1934, 1 dez. 2019b.

MORGAN, EL et al. Stat3 activation by E6 is essential for the differentiation-dependent HPV18 life cycle. **PLoS Pathog**, v. 14, p. e1006975, 2018.

MORGAN, EL; MACDONALD, A. Autocrine STAT3 activation in HPV positive cervical cancer through a virus-driven Rac1-NFκB-IL-6 signalling axis. **PLoS Pathog**, v. 15, p. e1007835, 2019a.

MORGAN, EL; MACDONALD, A. Manipulation of JAK/STAT signalling by high-risk HPVs: potential therapeutic targets for HPV-associated malignancies. **Viruses**, v. 12, p. 977, 2020.

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

MUKHERJEE, S. et al. STAT3 mediated IL-17 production by post-septic T cells exacerbates viral immunopathology of the lung. **Shock**, v. 38, p. 515–523, 2012.

MULHERKAR, R. et al. Human papillomavirus (HPV) genome status & cervical cancer outcome: A retrospective study. **Indian Journal of Medical Research**, v. 142, p. 525–532, 2015.

MÜNGER, K. et al. Mechanisms of human Papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of virology**, v. 78, n. 21, p. 11451–11460, 2004.

NACHIRA, D. et al. The Role of Human Papilloma Virus (HPV) in Primary Lung Cancer Development: State of the Art and Future Perspectives. **Life**, v. 14, n. 1, p. 110–110, 10 jan. 2024.

NASCIMENTO, K. C. G. et al. HPV detection in breast tumors and associated risk factors in northeastern Brazil. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 13, p. 1132, 2024.

NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, jan. 2015.

NELSON, L. M.; ROSE, R. C.; MOROIANU, J. Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 23958–23964, 2002.

NETWORK, THE CANCER GENOME ATLAS. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature Cell Biology**, v. 17, p. 576–582, 2015.

NGOZI DOM-CHIMA; BISWAS-FISS, E.; BISWAS, S. A Systematic Review of Human Papillomavirus Genotypes in Women With Normal Cervical Cytology: The Brazilian Paradigm. **Research Square (Research Square)**, 6 jul. 2021.

NOWIŃSKA, K. et al. The role of human papillomavirus in oncogenic transformation and its contribution to the etiology of precancerous lesions and cancer of the larynx: A review. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wrocław Medical University**, v. 26, n. 3, p. 539–547, 2017.

NTZIACHRISTOS, P. et al. From Fly Wings to Targeted Cancer Therapies: A Centennial for Notch Signaling. **Cancer cell**, v. 25, n. 3, p. 318–334, 17 mar. 2014.

O'CONNOR, M. et al. Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs. **The Human Papillomaviruses Compendium III-21-40**, p. 21-95, 1995.

OKODO, M. et al. Uniplex E6/E7 PCR method detecting E6 or E7 genes in 39 human papillomavirus types. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 5, p. 981–988, 30 jan. 2018.

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

PAGLIUSI, S. R.; GARLAND, S. M. International Standard Reagents for HPV Detection. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 283–296, 2007.

PANDEY, D. et al. Human Papillomavirus (HPV) Infection in Early Pregnancy: Prevalence and Implications. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2019, p. 1–5, 24 mar. 2019.

PANDEY, M.; BHOSALE, P. G.; MAHIMKAR, M. B. Detection of HPV E6/E7 mRNA in clinical samples using RNA in situ hybridization. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1726, p. 167–175, 2018.

PARFENOV, M. et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 15544–15549, 2014.

PARK, J. S. et al. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancers. **Gynecologic Oncology**, v. 65, p. 121–129, 1997.

PARK, J.-S. et al. Inactivation of Interferon Regulatory Factor-1 Tumor Suppressor Protein by HPV E7 Oncoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 10, p. 6764–6769, 10 mar. 2000.

PARK, R. B.; ANDROPHY, E. J. Genetic Analysis of High-Risk E6 in Episomal Maintenance of Human Papillomavirus Genomes in Primary Human Keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 76, n. 22, p. 11359–11364, 15 nov. 2002.

PASTRANA, D. V. et al. Metagenomic discovery of 83 new human Papillomavirus types in patients with immunodeficiency. **mSphere**, v. 3, n. 6, 2018.

PEDROZA-SAAVEDRA, A. et al. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein synergizes with EGF-receptor signaling to enhance cell cycle progression and the down-regulation of p27Kip1. **Virology**, v. 400, n. 1, p. 44–52, abr. 2010.

PETERSON, C. et al. Detection of Human Papillomavirus in Squamous Lesions of the Conjunctiva Using RNA and DNA In-Situ Hybridization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7249–7249, 29 jun. 2022.

PETRY, K. U. HPV and cervical cancer. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 74, n. sup244, p. 59–62, 2014.

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

PIRES, A. et al. Evidence for an Association of Human Papillomavirus and Breast Carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 84, n. 2, p. 131–137, 1 mar. 2004.

PIZZIGHELLA, S. et al. Simultaneous polymerase chain reaction detection and restriction typing for the diagnosis of human genital papillomavirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 55, n. 2, p. 245–256, out. 1995.

PRESCOTT, E. L. et al. Human papillomavirus type 1 E1AE4 protein is a potent inhibitor of the serine-arginine (SR) protein kinase SRPK1 and inhibits phosphorylation of host SR proteins and of the viral transcription and replication regulator E2. **Journal of Virology**, v. 88, p. 12599–12611, 2014.

PROUDFOOT, N. J. Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6291, 2016.

PYEON, D. et al. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathogens**, v. 5, p. e1000318, 2009.

RAFFA, A. B. et al. The evolving field of research on human papillomavirus receptors: a review of binding and entry. **Journal of Virology**, v. 87, p. 6062–6072, 2013.

REUSCHENBACH, M. et al. Methylation status of HPV16 E2-binding sites classifies subtypes of HPV-associated oropharyngeal cancers. **Cancer**, v. 121, p. 1966–1976, 2015.

RICHARDS, KH et al. Human papillomavirus E7 oncoprotein increases production of the anti-inflammatory interleukin-18 binding protein in keratinocytes. **J Virol**, v. 88, p. 4173–4179, 2014.

RICHARDS, KH et al. The human papillomavirus (HPV) E7 protein antagonises an imiquimod-induced inflammatory pathway in primary human keratinocytes. **Sci Rep**, v. 5, p. 12922, 2015.

RICHTER, K. et al. Age-specific prevalence of cervical human papillomavirus infection and cytological abnormalities in women in Gauteng Province. **South African medical journal**, v. 103, n. 5, p. 313, 2013.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1–2, p. 138–168, 2013.

ROOPER, L. M. et al. RNA in-situ hybridization is a practical and effective method for determining HPV status of oropharyngeal squamous cell carcinoma including discordant cases that are p16 positive by immunohistochemistry but HPV negative by DNA in-situ hybridization. **Oral Oncology**, v. 55, p. 11–16, abr. 2016.

ROSEN, E. M.; FAN, S.; ISAACS, C. BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, n. 3, p. 533–548, set. 2005.

ROSENDO-CHALMA, P. et al. The Hallmarks of Cervical Cancer: Molecular Mechanisms Induced by Human Papillomavirus. **Biology**, v. 13, n. 2, p. 77, 2024.

ROSET BAHMANYAR, E. et al. Prevalence and risk factors for cervical HPV infection and abnormalities in young adult women at enrolment in the multinational PATRICIA trial. **Gynecologic Oncology**, v. 127, n. 3, p. 440–450, dez. 2012.

RUGHOPUTH, S. et al. Detection of human papillomavirus from archival tissues in cervical cancer patients in Mauritius. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 2, p. 173–178, fev. 2006.

RUSSNES, H. G. et al. Breast Cancer Molecular Stratification. **The American Journal of Pathology**, v. 187, n. 10, p. 2152–2162, out. 2017.

SAKAKIBARA, N.; MITRA, R.; MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E1 Helicase Activates a Cellular DNA Damage Response in Viral Replication Foci. **Journal of Virology**, v. 85, p. 8981–8995, 2011.

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

SANDERS, C. M.; STENLUND, A. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 3522–3534, 2000.

SANTIVASI, W. L. et al. Association between cytosolic expression of BRCA1 and metastatic risk in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 3, p. 453–459, 9 jun. 2015.

SASAGAWA, T. et al. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. **PubMed**, v. 10, n. 1, p. 45–52, 1 jan. 2001.

SATANOVA, A. et al. The global prevalence of human Papillomavirus causing cervical cancer: A literature review. **Oncology and radiology Kazakhstan**, v. 65, n. 3, p. 42–46, 2022.

SCARTH, J. A. et al. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *Journal of General Virology*, v. 102, n. 3, 1 mar. 2021.

SCHÄFER, G. et al. Vimentin modulates infectious internalization of human papillomavirus 16 pseudovirions. **Journal of virology**, v. 91, n. 16, p. 10.1128/jvi.00307-17, 2017.

SCHEURER, M. E. et al. Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. **Infectious Agents and Cancer**, v. 2, n. 1, 2 abr. 2007.

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lanceta**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, 2007.

SCHILLER, J. T. et al. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, p. T12–T17, 2010.

SCHLECHT, N. F. et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Modern pathology: an official journal of*

the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, v. 24, n. 10, p. 1295–1305, 2011.

SCOTT, M. L. et al. Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. **Journal of Virology**, v. 94, n. 2, 6 jan. 2020.

SCOTT, M. L. et al. Human papillomavirus type 16 E5-mediated upregulation of Met in human keratinocytes. **Virology**, v. 519, p. 1–11, 1 jun. 2018.

SHAFTI-KERAMAT, S.; Handisurya, A.; Kriehuber, E.; Slupetzky, K.; Kirnbauer, R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 77, p. 13125–13135, 2003.

SHEN-GUNTHER, J.; YU, X. HPV molecular assays: defining analytical and clinical performance characteristics for cervical cytology specimens. **Gynecologic oncology**, v. 123, n. 2, p. 263–271, 2011.

SHUKLA, S. et al. Physical state & copy number of high risk human papillomavirus type 16 DNA in progression of cervical cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, p. 531–543, 2014.

SILVA, R. G.; DA SILVA, B. B. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 1, p. 261–264, 24 ago. 2010.

SONGOCK, W. K.; KIM, S.-M.; BODILY, J. M. The human papillomavirus E7 oncoprotein as a regulator of transcription. **Virus Research**, v. 231, p. 56–75, 2017.

SOUZA, J. L. P. DE et al. Perfil histopatológico e molecular do câncer de mama em mulheres assistidas em centro de oncologia do Agreste Pernambucano. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 38–46, 20 dez. 2019.

SPANGLE, JM; MUNGER, K. The HPV16 E6 oncoprotein causes prolonged receptor protein tyrosine kinase signaling and enhances internalization of phosphorylated receptor species. **PLoS Pathog**, v. 9, p. e1003237, 2013.

SPINK, K. M.; LAIMINS, L. A. Induction of the Human Papillomavirus Type 31 Late Promoter Requires Differentiation but Not DNA Amplification. **Journal of Virology**, v. 79, n. 8, p. 4918–4926, 1 abr. 2005.

SPRIGGS, C.; LAIMINS, L. Human Papillomavirus and the DNA damage response: Exploiting host repair pathways for viral replication. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 232, 2017.

SRIKANT AMBATIPUDI et al. DNA methylome analysis identifies accelerated epigenetic ageing associated with postmenopausal breast cancer susceptibility. **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 299–307, 1 abr. 2017.

STOLER, M. H. et al. Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridisation with message-specific RNA probes. **Virology**, v. 172, p. 331–340, 1989.

STOLER, M. H.; BROKER, T. R. In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma. **Human Pathology**, v. 17, n. 12, p. 1250–1258, dez. 1986.

STONE, S. C. et al. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 2, n. 2, p. 63–75, 18 maio 2014.

SURVILADZE, Z.; DZIDUSZKO, A.; OZBUN, M. A. Essential roles for heparan sulfate proteoglycans associated with soluble virions and growth factors in human papillomavirus infections. **PLoS Pathogens**, v. 8, p. e1002519, 2012.

TAKAHASHI, Y et al. Pten tumor suppressor associates with NHERF proteins to attenuate PDGF receptor signaling. **Embo J**, v. 25, p. 910–920, 2006.

THAKUR, K. et al. Physical interaction between STAT3 and AP1 in cervical carcinogenesis: Implications in HPV transcription control. *Biochimica et biophysica acta*. **Molecular basis of disease**, v. 1869, n. 8, p. 166817–166817, 1 dez. 2023.

THOMAS, J. T. et al. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human

keratinocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 15, p. 8449–8454, 20 jul. 1999.

THOMAS, M; BANKS, L. The biology of papillomavirus PDZ associations: what do they offer papillomaviruses? **Curr Opin Virol**, v. 51, p. 119–126, 2021.

THOMAS, SJ et al. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. **Br J Cancer**, v. 113, p. 365–371, 2015.

THORLAND, E. C. et al. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. **Oncogene**, v. 22, p. 1225–1237, 2003.

THORLAND, E. C. et al. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. **Cancer Research**, v. 60, p. 5916–5921, 2000.

TIAN, B.; MANLEY, J. L. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature reviews*. **Molecular cell biology**, v. 18, n. 1, p. 18–30, 2017.

TIROSH, O. et al. Expanded skin virome in DOCK8-deficient patients. **Nature medicine**, v. 24, n. 12, p. 1815–1821, 2018.

TJALMA, W. A. A.; DEPUYDT, C. E. Cervical cancer screening: which HPV test should be used—L1 or E6/E7?. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 170, n. 1, p. 45-46, 2013.

TSAKOIANNIS, D. et al. Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. **Archives of Virology**, v. 160, n. 1, p. 207–214, 25 out. 2014.

TSAO, Y. P. et al. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sd1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 70, n. 11, p. 7535–7539, nov. 1996.

UKPO, O. C. et al. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 35, n. 9, p. 1343–1350, 2011.

ULLAH, M. I. et al. Molecular pathways in the development of HPV-induced oropharyngeal cancer. **Cell Communication and Signaling : CCS**, v. 21, p. 351, 14 dez. 2023.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). FDA Executive Summary: **New Approaches to Evaluating High-Risk Human Papillomavirus Nucleic Acid Detection Devices**. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/122799/download>. Acesso em: 04 mai. 2024.

VAN MAAREN, M. C. et al. Ten-year recurrence rates for breast cancer subtypes in the Netherlands: A large population-based study. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 2, p. 263–272, 28 nov. 2018.

VAN TINE, B. A. et al. Clonal selection for transcriptionally active viral oncogenes during progression to cancer. **Journal of Virology**, v. 78, p. 11172–11186, 2004.

VANDE POL, SB; KLINGELHUTZ, AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v. 445, p. 115–137, 2013.

VELDMAN, T. et al. Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4467–4472, 1 maio 2001.

VENUTI, A.; PAOLINI, F. HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer. **Head and Neck Pathology**, v. 6, n. S1, p. 63–74, jul. 2012.

VERÍSSIMO FERNANDES, J. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. **Molecular medicine reports**, 2011.

VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Differential methylation of the HPV 16 upstream regulatory region during epithelial differentiation and neoplastic transformation. **PLoS ONE**, v. 6, e24451, 2011.

VLIET-GREGG, PA et al. NFX1-123 and human papillomavirus 16E6 increase Notch expression in keratinocytes. **J Virol**, v. 87, p. 13741–13750, 2013.

WANG, F. et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 14, n. 1, p. 22–29, 2012.

WANG, H.-K. et al. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. **Genes & Development**, v. 23, n. 2, p. 181–194, 15 jan. 2009.

WANG, Q. et al. Phosphorylation of the human Papillomavirus type 16 E1^{E4} protein at T57 by ERK triggers a structural change that enhances keratin binding and protein stability. **Journal of virology**, v. 83, n. 8, p. 3668–3683, 2009.

WANG, W.-M.; CHUNG, M.-H.; HUANG, S.-M. Regulation of nuclear receptor activities by two human papillomavirus type 18 oncoproteins, E6 and E7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 3, p. 932–939, abr. 2003.

WANG, X. et al. Viral DNA replication orientation and hnRNPs regulate transcription of the human Papillomavirus 18 late promoter. **mBio**, v. 8, n. 3, 2017a.

WANG, Y. et al. HPV Status and Its Correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and Survivin Expression in Breast Cancer in a Chinese Population. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–7, 1 jan. 2017c.

WANG, Y. X. et al. HPV16 E6 promotes breast cancer proliferation via upregulation of COX-2 expression. **BioMed research international**, v. 2017, p. 1–12, 2017b.

WARBURTON, A. et al. HPV integration hijacks and multimerizes a cellular enhancer to generate a viral-cellular super-enhancer that drives high viral oncogene expression. **PLoS Genetics**, v. 14, e1007179, 2018.

WARREN, C. et al. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 233, 21 ago. 2017.

WENTZENSEN, N. et al. Eurogin 2016 Roadmap: how HPV knowledge is changing screening practice: Eurogin 2016 Roadmap. **International journal of cancer**, v. 140, n. 10, p. 2192–2200, 2017.

WOODHAM, A. W. et al. The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. **PLoS ONE**, v. 7, p. e43519, 2012.

YADAV, R. et al. Cytomorphological spectrum of breast fine needle aspiration cytology using the International Academy of Cytology Yokohama System and evaluation of associated risk of malignancy— A retrospective study in a tertiary care centre. **Surgical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 1, 10 maio 2024.

YASMEEN, A. et al. E6/E7 of HPV Type 16 Promotes Cell Invasion and Metastasis of Human Breast Cancer Cells. **Cell Cycle**, v. 6, n. 16, p. 2038–2042, 15 ago. 2007.

YIM, E.-K.; PARK, J.-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research and Treatment**, v. 37, n. 6, p. 319, 2005.

YOUNG, C. C. et al. Development and validation of a reliable DNA copy-number-based machine learning algorithm (CopyClust) for breast cancer integrative cluster classification. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 22 nov. 2023.

YU, L.; MAJERCIAK, V.; ZHENG, Z.-M. HPV16 and HPV18 genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 9, p. 4943, 2022.

YU, W.; GAN, Q.; GONG, Y. The Yokohama System for Reporting Breast Cytopathology. **Journal of Clinical and Translational Pathology**, v. 3, n. 2, p. 99–105, 28 jun. 2023.

ZAGOURAS, P. et al. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, p. 6414–6418, 1995.

ZHANG, B.; LI, P.; WANG, E.; BRAHMI, Z.; DUNN, K. W. et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. **Virology**, v. 310, p. 100–108, 2003.

ZHANG, H. et al. Revealing the secrets of PCR. Sensors and Actuators B: **Chemical**, v. 298, p. 126924, nov. 2019.

ZHANG, N. et al. Human papillomavirus infection correlates with inflammatory Stat3 signaling activity and IL-17 expression in patients with breast cancer. **PubMed**, v. 8, n. 7, p. 3214–26, 1 jan. 2016.

ZHANG, Y. et al. BRCA1 Interaction with Human Papillomavirus Oncoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 39, p. 33165–33177, 27 jun. 2005.

ZHAO, Z. et al. Inhibitor of Differentiation 1 (Id1) in Cancer and Cancer Therapy. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 8, p. 995–1005, 6 abr. 2020.

ZHENG, Z.-M.; WANG, X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. **Biochimica et biophysica acta**. Gene regulatory mechanisms, v. 1809, n. 11–12, p. 668–677, 2011.

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