



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

STEPHANIE LOUREIRO LEÃO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A
VIAS IMUNOLÓGICAS EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA
MDA-MB-231 EXPRESSANDO ONCOPROTEÍNAS DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Recife
2025

STEPHANIE LOUREIRO LEÃO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A
VIAS IMUNOLÓGICAS EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA
MDA-MB-231 EXPRESSANDO ONCOPROTEÍNAS DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

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
2025

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

Leão, Stephanie Loureiro.

Avaliação da expressão de genes associados às vias imunológicas em células tumorais de mama MDA-MB-231 expressando oncoproteínas do Papilomavírus humano / Stephanie Loureiro Leão. - Recife, 2025.

70 p. : il., tab.

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, 2025.

Inclui referências.

1. Neoplasia Mamária. 2. Oncogenes. 3. HPV. 4. Fator de transcrição. 5. Transfecção. I. Freitas, Antonio Carlos de. (Orientação). II. Santos, Vanessa Emanuelle Pereira. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

STEPHANIE LOUREIRO LEÃO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS A VIAS
IMUNOLÓGICAS EM CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA MDA-MB-231
EXPRESSANDO ONCOPROTEÍNAS DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

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: ____/____/____

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

Dra. Bianca de França São Marcos
Universidade Federal de Pernambuco/ Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia
Experimental - LEMTE

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador, o Professor Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela oportunidade de fazer parte do LEMTE e por sua orientação ao longo dos anos, que contribuiu para meu crescimento como pesquisadora.

A minha co-orientadora, Dra. Vanessa Emanuelle Pereira Santos, por ter sido luz e por ter me incentivado a ser mais forte em um dos momentos mais difíceis na minha vida. Minha eterna gratidão pela orientação e suporte.

A Dra. Daffany Luana do Santos, minha ex co-orientadora, por ter me acolhido desde o primeiro dia e por todos os ensinamentos que me auxiliaram nessa caminhada científica.

Aos meus amigos de laboratório, que se tornaram parte da minha família na UFPE, Bia, Gabriel, Pedro e David, por tornarem a rotina mais leve e por dividirem comigo seus conhecimentos.

A todos que fazem parte do LEMTE pelos valiosos ensinamentos compartilhados e por tornarem o laboratório um ambiente tão enriquecedor e acolhedor, onde é um privilégio estar.

Ao meu noivo, Matheus Henrique, que foi o meu pilar durante minha jornada acadêmica. Sua motivação, compreensão e apoio foram fundamentais para eu seguir em frente. Em uma infinidade de vezes, ele soube arrancar sorrisos de mim nos momentos mais difíceis, quando eu acreditava que não tinha mais forças. Sou eternamente grata por tê-lo ao meu lado em todos os momentos, compartilhando das coisas boas às ruins. Obrigada por sempre acreditar em mim, ainda quando eu mesma duvidava.

Aos meus pais, Walter e Mônica, que desde sempre me incentivaram a buscar o meu melhor. Desde pequena, me apoiaram em minhas decisões e sempre afirmaram com convicção que tudo daria certo (mesmo quando nem sempre foi assim). Agradeço também à minha irmã, Allanys, que, independentemente dos altos e baixos, esteve ao meu lado. Sem o apoio, a motivação e o amor incondicional de vocês, eu não teria chegado até aqui.

A CNPq pelo apoio financeiro.

“Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

(Albert Einstein)

LOUREIRO LEÃO, Stephanie. **Avaliação da Expressão de Genes Associados à Vias Imunológicas em Células Tumorais de Mama MDA-MB-231 Expressando Oncoproteínas do Papilomavírus Humano**. 2025. 71 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

O câncer de mama é uma das neoplasias mais comuns entre mulheres, com 11,7% de incidência global e 685.000 mortes registradas em 2020. Entre os diferentes subtipos, o triplo-negativo é o mais agressivo, com alta taxa de recorrência e sem alvos terapêuticos específicos. O Papilomavírus Humano (HPV) tem sido investigado como possível fator de risco, embora sua relação com o câncer de mama permaneça em investigação. As oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV podem modular vias de sinalização e fatores de transcrição, alterando o microambiente tumoral (TME), que é composto por células tumorais, imunológicas e matriz extracelular. Marcadores moleculares, como a via JAK/STAT e fatores FOXO, são fundamentais para compreender o TME e seu papel na progressão tumoral. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar a expressão dos fatores de transcrição associados ao microambiente tumoral no câncer de mama, STAT4, JAK2, STAT6, STAT3 e FOXO4, utilizando um modelo experimental *in vitro*. Foi realizada a construção de vetores contendo os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV16, clonados em pcDNA3.1 para expressão em células MDA-MB-231 (linhagem celular de carcinoma mamário triplo-negativo) que foram, em seguida, cultivadas e transfectadas com os oncogenes de forma individual. Posteriormente, o RNA foi extraído e utilizado para a síntese de cDNA, seguido da quantificação da expressão por PCR quantitativa em tempo real. Os resultados demonstram que a expressão de STAT4 foi reduzida nas células transfectadas com E5, E6 e E7, indicando que essas oncoproteínas podem interferir nas vias de sinalização reguladas por esse fator de transcrição. JAK2 mostrou tendência de aumento com E5, enquanto sua expressão foi significativamente reduzida com E6 e E7, sugerindo modulação negativa na via JAK/STAT. A expressão de STAT6 aumentou com E5, mas foi reduzida na presença de E6. A expressão de STAT3 foi reduzida com E7 e aumentou discretamente com E5. O gene FOXO4 apresentou um leve aumento na presença de E7, sem alterações significativas com E5 e E6. Esses resultados indicam que os oncogenes do HPV podem modular a expressão de fatores de transcrição importantes no TME do câncer de mama, induzindo a regulação de vias críticas associadas à sobrevivência celular e proliferação, o que pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral no câncer de mama triplo negativo.

Palavras-chave: Neoplasia Mamária. Oncogenes. HPV. Fator de transcrição. Transfecção.

LOUREIRO LEÃO, Stephanie. **Evaluation of Gene Expression Associated with Immunological Pathways in MDA-MB-231 Breast Tumor Cells Expressing Human Papillomavirus Oncoproteins**. 2025. 71 pages. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common malignancies among women, accounting for 11.7% of global incidence and 685,000 deaths recorded in 2020. Among its subtypes, triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive, characterized by a high recurrence rate and the absence of specific therapeutic targets. Human Papillomavirus (HPV) has been investigated as a potential risk factor, although its association with breast cancer remains controversial. The HPV oncoproteins E5, E6, and E7 can modulate signaling pathways and transcription factors, altering the tumor microenvironment (TME), which consists of tumor cells, immune cells, and the extracellular matrix. Molecular markers, such as the JAK/STAT pathway and FOXO factors, are fundamental for understanding the TME and its role in tumor progression. Thus, the present study aimed to investigate the expression of transcription factors associated with the TME in breast cancer, including STAT4, JAK2, STAT6, STAT3, and FOXO4, using an in vitro experimental model. Vectors containing the HPV16 oncogenes E5, E6, and E7 were constructed and cloned into pcDNA3.1 for expression in MDA-MB-231 cells (a triple-negative breast cancer cell line). These cells were then cultured and transfected individually with the oncogenes. Subsequently, RNA was extracted and used for cDNA synthesis, followed by quantitative real-time PCR to assess gene expression. The results demonstrated that STAT4 expression was reduced in cells transfected with E5, E6, and E7, indicating that these oncoproteins might interfere with signaling pathways regulated by this transcription factor. JAK2 expression showed an increasing trend with E5, while it was significantly reduced with E6 and E7, suggesting negative modulation of the JAK/STAT pathway. STAT6 expression increased with E5 but was reduced in the presence of E6. STAT3 expression was reduced with E7 and slightly increased with E5. FOXO4 expression exhibited a mild increase in the presence of E7, with no significant changes observed with E5 and E6. These findings suggest that HPV oncogenes can modulate the expression of critical transcription factors in the breast cancer TME, inducing the regulation of key pathways associated with cell survival and proliferation. This may contribute to a better understanding of the mechanisms involved in tumor progression in triple-negative breast cancer.

Key words: Breast Neoplasia. Oncogenes. HPV. Transcription Factor. Transfection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Representação espacial do número de casos de neoplasia maligna da mama estimadas no ano de 2022, segundo Unidade da Federação. _____ 18
- Figura 2:** Resumo esquemático com os principais tipos do câncer de mama de acordo com a classificação histológica. _____ 19
- Figura 3:** Genoma do Papilomavírus humano. Organização do genoma de HPV16, mostrando a região longa de controle (LCR) e as proteínas precoces e tardias. As proteínas precoces do HPV E1, E2, E4, E5, E6 e E7 estão mostradas nas cores roxa, azul escuro, rosa escuro, laranja, azul claro e vermelho respectivamente. As proteínas da região tardia, L1 e L2, estão de rosa e verde, respectivamente. _____ 23
- Figura 4:** Ciclo de replicação do HPV. Inicialmente, ocorre a entrada do vírus através de microlesões no tecido e permanece latente no interior das células basais, com baixa taxa de proliferação. Posteriormente, há um aumento na taxa proliferativa e atuação das proteínas precoces. Os vírus são montados e, por fim, os vírions são secretados pelos queratinócitos. _____ 25
- Figura 5:** Mecanismo potencial para a transmissão do HPV para o tecido mamário. Duas hipóteses são apresentadas: transmissão sexual, por contato sexual ou genital com o seio; e disseminação hematogênica e/ou linfática, na qual o HPV ultrapassa o sítio original (infecção cervical) atingindo o tecido mamário. _____ 26
- Figura 6:** Componentes do microambiente tumoral. O microambiente tumoral é uma estrutura heterogênea composta pelas células tumorais, células estromais, como fibroblastos, células imunológicas e rico em citocinas e quimiocinas. _____ 28
- Figura 7:** Diferenciação de células T CD4+ virgens em subtipos efetores Th1, Th2, Th17 e Th22, mediada por vias de sinalização específicas. As caixas destacadas em rosa (JAK2, STAT4, STAT6, STAT3 e FOXO4) representam os marcadores moleculares analisados no trabalho. _____ 30
- Figura 8:** Visão geral da sinalização JAK–STAT na regulação da tumorigênese. Ao se ligarem aos receptores, as citocinas tipo I e II transduzem sinais intracelulares por meio da via JAK-STAT. Os domínios citoplasmáticos dos receptores de citocinas estão associados a vários JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), que atuam por meio da autofosforilação e fosforilação de STATs. _____ 35

Figura 9: Grupos de transfecção: MDA cultivado com pcDNA 3.1 (vetor vazio); MDA transfectado com o oncogene E5; MDA transfectado com o oncogene E6; MDA transfectado com o oncogene E7. _____ 38

Figura 10: Curva Ct e Melting referente à expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 transfectados em células MDA-MB-231. _____ 41

Figura 11: Expressão diferencial de fatores de transcrição (STAT3, FOXO4, JAK2, STAT4 e STAT6) em linhagens celulares MDA-MB-231 com e sem transfecccção com os oncogenes do HPV. _____ 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais subtipos moleculares do câncer de mama de acordo com a presença de marcadores de imuno-histoquímica: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e Ki-67, marcador de proliferação celular. _____ 20

Tabela 2: Apresentação das principais funções das proteínas precoces presentes no genoma do HPV. _____ 24

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento (T.a.). _ 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	Beta actina
AKT	Proteína quinase B
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
BLV	Vírus da Leucemia Bovina
BNC2	Proteína de dedo de zinco basonuclina 2
BRCA1	Câncer de mama 1
BRCA2	Câncer de mama 2
CC	Quimiocina C
CCL2	Ligante de quimiocina do motivo CC 2
CCL20	Ligante de quimiocina do motivo CC 20
CCL5	Ligante de quimiocina do motivo CC 5
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal In Situ
cDNA	DNA complementar
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CLIS	Carcinoma Lobular In Situ
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
CX3C	Quimiocina do motivo CX3C 1
CXC	Quimiocina do motivo CXC
CXCL9	Ligante de quimiocina do motivo CXC 9
CXCR2	Receptor de quimiocina do motivo CXC 2
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein–Barr
EF1A1	Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa 1
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ER	Receptor de estrogênio
FOXO	Forkhead Box O
FOXO1	Forkhead Box O 1
FOXO3	Forkhead Box O 3
FOXO4	Forkhead Box O 4
FOXO6	Forkhead Box O 6
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HER2	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2
HPV	Papilomavirus Humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IFN	Interferon
IFN-1	Interferon tipo I
IFN-γ	Interferon gama
IFN-α	Interferon alfa
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina

IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-13	Interleucina 13
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
JAK	Janus Quinase
JAK1	Janus Quinase 1
JAK2	Janus Quinase 2
JAK3	Janus Quinase 3
JAK/STAT	Janus Quinase/Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição
KI-67	Antígeno Kiel 67
LCR	Região longa de controle
Let-7a	Gene letal-7a
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
MHC-1	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe 1
miR-21	MicroRNA 21
MMTV	Vírus do Tumor Mamário do Camundongo
MXRA8	Proteína 8 associada à remodelação da matriz
NK	Células Natural Killer
p107	Proteína 1 semelhante ao retinoblastoma
p130	Proteína 2 semelhante ao retinoblastoma
p21	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1
p53	Proteína de tumor p53
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PR	Receptor de progesterona
pRB	Proteína do retinoblastoma
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RNA	Ácido ribonucleico
RORyt	Receptor Órfão Relacionado ao Ácido Retinoico Gama T
RRP	Papilomatose respiratória recorrente
RT-qPCR	PCR quantitativo em tempo real
Slug	Proteína de dedo de zinco Slug
SNAI1	Proteína de dedo de zinco SNAI1
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição
STAT1	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1

STAT2	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 2
STAT3	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
STAT4	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 4
STAT5a	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5a
STAT5b	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 5b
STAT6	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 6
TAMs	Macrófagos Associados ao Tumor
TANs	Neutrófilos Associados ao Tumor
Th	Célula T auxiliar
TLR9	Receptor Toll-like 9
TME	Microambiente Tumoral
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T reguladora
Twist1	Proteína relacionada à torção 1
TYK	Tirosina quinase
WHO	World Health Organization
XC	Quimiocina do motivo XC
ZEB1	Homeobox 1 de ligação à caixa E do dedo de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	CÂNCER DE MAMA	17
2.1.1	Classificação Histológica e Molecular	17
2.1.2	Fatores de risco	19
2.2	Papilomavírus Humano	20
2.2.1	Infecção e carcinogênese	23
2.2.2	Câncer de mama e infecção	24
2.3	Microambiente tumoral	26
2.3.1	Microambiente tumoral presença do HPV	31
2.3.2	Microambiente tumoral no câncer de mama	31
2.4	Marcadores moleculares para o estudo do microambiente tumoral	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	CONSTRUÇÃO DE VETORES	38
4.2	Cultivo e transfecção em células eucarióticas	38
4.3	Extração de RNA e síntese de cDNA	39
4.4	qPCR em tempo real	40
4.5	Análise estatística	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Confirmação da transfecção	41
5.2	Análise de expressão gênica	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 Introdução

Com incidência de 11,7%, o câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comuns em mulheres, representando 25,4% de todos os tipos (WHO, 2024). Em 2020, 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, com uma taxa de mortalidade de 685.000 em todo o mundo (WHO, 2024). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2022, o Brasil teve uma incidência de 73.610 casos desse tipo de câncer, e 17.825 óbitos associados a neoplasias mamárias (INCA, 2024).

O câncer de mama é classificado histologicamente em subtipos como carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI), sendo o CDI o mais prevalente (Nascimento; Otoni, 2020). A classificação molecular, essencial para compreender a biologia tumoral e definir estratégias terapêuticas, inclui os subtipos luminal A, luminal B, HER2-positivo e triplo-negativo, sendo o último associado a um comportamento clínico agressivo e prognóstico desfavorável (Zhang, 2022; Johnson; Conant; Soo, 2020; Derakhshan; Reis-Filho, 2022).

O câncer de mama está associado a diversos fatores de risco, sendo o sexo feminino o mais relevante (Purrahman *et al.*, 2022). Outros fatores incluem idade avançada, obesidade, consumo de álcool, histórico familiar, exposição à radiação, nuliparidade, menopausa tardia, terapia de reposição hormonal, uso de anticoncepcionais, predisposições hormonais e genéticas, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, menarca precoce e menopausa tardia e, nos últimos anos, infecções virais, como a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) e o Vírus Epstein-Barr (EBV), têm sido apontados como possíveis fatores de risco (Kamińska *et al.*, 2015; Wilkinson; Gathani, 2021; Lawson; Salmons; Glenn, 2018).

O HPV é investigado como possível fator de risco no câncer de mama, embora os mecanismos dessa relação ainda sejam incertos (Karachalios *et al.*, 2023). Transmitido predominantemente por contato sexual, é a infecção viral sexualmente transmissível mais comum, entretanto, apenas 1% a 2% das infecções persistentes por tipos de alto risco evoluem para lesões pré-cancerosas (Nelson; Mirabello *et al.*, 2023). O HPV é um vírus de DNA de fita dupla, com mais de 200 tipos classificados em baixo e alto risco (Scarth *et al.*, 2021). Seu genoma, dividido em regiões precoce, tardia e de controle, regula oncogenes como E5, E6 e E7, que interagem com vias de sinalização e fatores de transcrição, podendo influenciar a carcinogênese (Oyouni,

2023; Basukala; Banks, 2021).

O microambiente tumoral (TME – do inglês, *Tumor Microenvironment*) é uma rede dinâmica composta por células tumorais, estromais, imunológicas e matriz extracelular, que interagem para influenciar o crescimento tumoral, a evasão imune e a progressão metastática, sendo modulado por fatores como hipóxia, inflamação e citocinas (Hinshaw; Shevde, 2019; Bejarano; Jordão; Joyce, 2021). O HPV contribui para a modificação do TME ao induzir imunossupressão, persistência viral e proliferação desordenada, com o recrutamento de células imunológicas mediado por citocinas e quimiocinas (Lebre *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2021). No câncer de mama, o TME é caracterizado por células imunossupressoras (TAMs, TANs) e linfócitos polarizados, além de citocinas como IL-6 e IL-17, que promovem inflamação, metástase e remodelação tecidual (Karpisheh *et al.*, 2022; Méndez-García *et al.*, 2019).

Fatores de transcrição têm sido utilizados para estudar o TME, uma vez que regulam a expressão de genes associados a vias imunológicas e interações celulares, permitindo identificação de padrões moleculares que influenciam a progressão do câncer (Allinen *et al.*, 2004). A via JAK/STAT, composta por proteínas Janus Quinases (JAKs) e Transdutoras de Sinal e Ativadoras da Transcrição (STATs), desempenha papel central na resposta imunológica e na progressão tumoral, sendo ativada por citocinas e associada à metástase e vigilância imunológica (Brooks; Putoczki, 2020). Já os fatores de transcrição *forkhead* da classe O (FOXOs), como FOXO4, agem como supressores tumorais, regulando apoptose e ciclo celular, sendo associados à inibição de diferentes tipos de câncer, incluindo o de mama (Qin *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2014). Esses fatores de transcrição destacam-se como alvos potenciais para terapias personalizadas e compreensão da complexidade tumoral.

A alteração da expressão de fatores de transcrição na presença do HPV pode contribuir para a carcinogênese e resistência terapêutica, destacando a necessidade de investigações mais aprofundadas para compreender melhor a interação entre o HPV e o câncer de mama, especialmente no subtipo triplo-negativo, tipo mais agressivo dentre esses carcinomas. Neste sentido, o presente estudo visa avaliar a expressão dos oncogenes do HPV em células tumorais de mama a fim de investigar os mecanismos pelos quais o vírus pode modular vias imunológicas e influenciar a carcinogênese mamária.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é um dos tipos de câncer mais comuns entre as mulheres, descrito como uma doença complexa e heterogênea, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais na mama, formando tumores (Siegel *et al.*, 2023; Sarhangi *et al.*, 2022). As células tumorais da mama apresentam alta capacidade de proliferação, mesmo na ausência de fatores que estimulam o crescimento, e capacidade de formar metástases, disseminando-se para linfonodos e órgãos distantes (Bernardes *et al.*, 2019). Quando metastático, o câncer de mama torna-se potencialmente fatal, com taxa de sobrevida em cinco anos inferior a 36% (Ruscitto *et al.*, 2022).

Em 2022, 2,29 milhões de pessoas foram diagnosticadas com câncer de mama no mundo e 670.000 mortes associadas à doença foram registradas; dentre esses casos, menos de 1% ocorreu entre a população masculina (WHO, 2024). Excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama representa a segunda neoplasia mais comum em todo o mundo, com incidência de 11,5% entre ambos os sexos, e 23,8% entre a população feminina (Ferlay *et al.*, 2024). De acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), estima-se que, em 2025, serão diagnosticados 2,5 milhões novos casos de câncer de mama no mundo, acompanhados de um aumento de 7% na mortalidade pela doença (Ferlay *et al.*, 2024).

No Brasil, o câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres e representa a principal causa de mortalidade por câncer nessa população (Lemos *et al.*, 2024). Em 2022, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram registrados aproximadamente 66.280 novos casos de câncer de mama no país (Figura 1), representando uma taxa ajustada de incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres (INCA, 2024). Para o triênio de 2023 a 2025, as estimativas apontam a ocorrência de 73 mil novos casos da doença por ano, reforçando a relevância do câncer de mama como um dos principais desafios de saúde pública no Brasil (INCA, 2024).

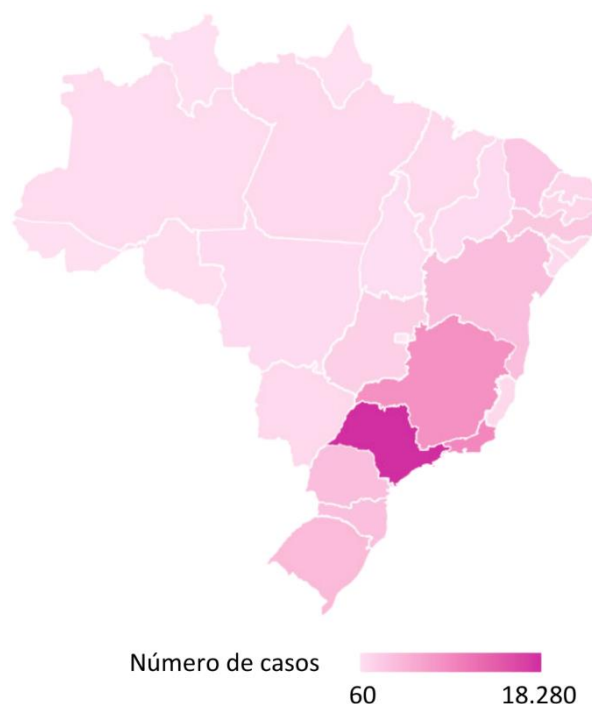


Figura 1: Representação espacial do número de casos de neoplasia maligna da mama estimadas no ano de 2022, segundo Unidade da Federação. Fonte: A Autora (2025).

2.1.1 Classificação Histológica e Molecular

Os tumores de mama são considerados altamente heterogêneos e podem ser classificados quanto à histopatologia ou presença de marcadores moleculares (Dieci *et al.*, 2014). A classificação histológica do câncer de mama considera aspectos morfológicos e proliferativos, proporcionando uma significância prognóstica que orienta a conduta clínica e terapêutica dos pacientes (Wang *et al.*, 2021). Em contrapartida, a classificação molecular do câncer de mama reflete diferenças nos padrões de expressão gênica, que estão associadas ao fenótipo individual, ao prognóstico da doença e ao planejamento do tratamento sistêmico (Nascimento; Otoni, 2020).

Os subtipos histológicos do câncer de mama incluem o carcinoma ductal invasivo (CDI), o carcinoma lobular invasivo (CLI), o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (Figura 2) (Nascimento *et al.*, 2024). O CDI, responsável por 70 a 80% de todos os casos, está frequentemente associado a um mau prognóstico e altas taxas de morbidade e mortalidade (Zhao, 2020; Patel, 2021). O CLI, considerado o segundo subtipo mais comum de câncer de mama invasivo, corresponde a até 15% dos casos diagnosticados, apresentando um pior prognóstico

a longo prazo em comparação ao CDI (McCart Reed *et al.*, 2021). O CDIS, que representa aproximadamente 20% das lesões mamárias diagnosticadas, se não tratado, pode evoluir para carcinoma invasivo em cerca de 12% dos casos (Wilson *et al.*, 2022). O CLIS é observado em até 3,6% das biópsias benignas de mama, sendo, na maioria dos casos, clinicamente silencioso e um precursor não obrigatório do carcinoma de mama invasivo (Sokolova; Lakhani, 2020).

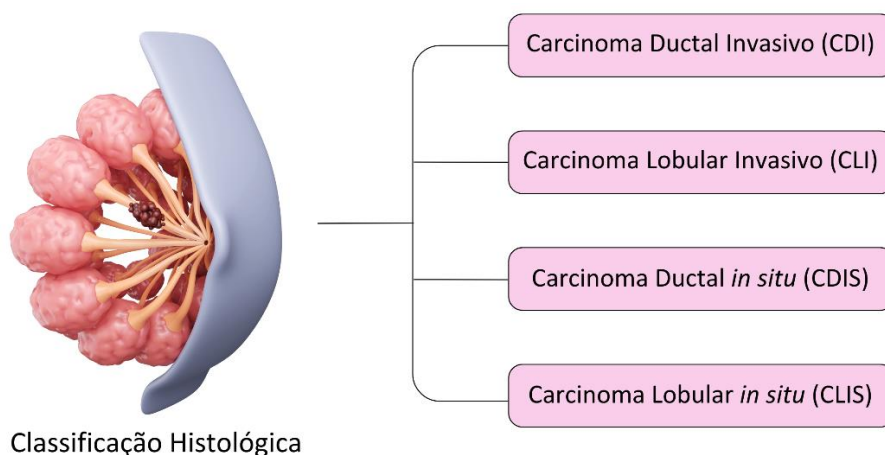


Figura 2: Resumo esquemático com os principais tipos do câncer de mama de acordo com a classificação histológica. Fonte: A Autora (2025).

Os subtipos moleculares do câncer de mama representam classificações baseadas na expressão gênica e em características biológicas que refletem diferenças no comportamento clínico e no prognóstico (Zhang, 2022). Os subtipos moleculares são comumente agrupados de acordo com a presença de marcadores de imuno-histoquímica: receptor de estrogênio positivo (ER+), receptor de progesterona positivo (PR+), receptor do fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2+) e Ki-67, marcador de proliferação celular associado à agressividade do câncer (Erber; Hartmann, 2020). Com isso, os quatro principais subtipos de câncer de mama amplamente reconhecidos são: luminal A, luminal B, HER2-positivo e triplo negativo (Tabela 1) (Orrantia-Borunda *et al.*, 2022).

Subtipo Molecular	ER	PR	Super HER2	Ki-67	Agressividade
Luminal A	+	+	-	< 15%	+
Luminal B	+/-	+/-	-	> 15%	++
HER2	-	-	+	> 20%	+++
Triplo Negativo	-	-	-	> 20%	+++

Tabela 1: Principais subtipos moleculares do câncer de mama de acordo com a presença de marcadores de imuno-histoquímica: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e Ki-67, marcador de proliferação celular. Fonte: Orrantia-Borunda *et al.*, 2022.

O câncer de mama luminal é o subtipo mais frequente, representando cerca de 70% dos casos, geralmente considerado menos agressivo do que outros subtipos (Höller *et al.*, 2023). O luminal A é o mais comum e apresenta um prognóstico favorável, sendo caracterizado como ER e PR positivos, HER2 negativo e baixos níveis de Ki-67 (Arima *et al.*, 2018). O luminal B apresenta uma maior taxa de proliferação celular e pior prognóstico, sendo caracterizado por ER e/ou PR positivos, HER2 negativo e Ki-67 elevado (Cheang *et al.*, 2009). Os tumores HER2, que representam cerca de 20% dos casos diagnosticados, são caracterizados pela ausência de expressão de ER e PR, expressão de HER2 e níveis elevados de Ki-67, resultando em uma forma mais agressiva da doença (Ogenyi *et al.*, 2022).

O câncer de mama triplo negativo é caracterizado pela ausência de expressão dos receptores hormonais, ER e PR, e pela ausência de superexpressão de HER2, configurando um subtipo agressivo, com células altamente proliferativas (Zagami; Carey, 2022). Devido à falta de marcadores específicos, pacientes com esse subtipo não se beneficiam de terapias endócrinas ou direcionadas a HER2, estabelecendo a quimioterapia não específica como o principal padrão de tratamento (Li *et al.*, 2022). O subtipo triplo negativo é associado a piores prognósticos entre os tipos de câncer de mama, causando metástase no sistema nervoso central em aproximadamente um terço dos pacientes, além de apresentar uma taxa de mortalidade de até 80% em um ano (Coelho *et al.*, 2024).

2.1.2 Fatores de risco

O câncer de mama é considerado uma doença multifatorial, associada a diversos fatores de risco, como componentes genéticos, comportamentais (modificáveis) e hormonais/reprodutivos (Huber-Keener, 2022). Estima-se que 5% a 10% dos cânceres de mama são atribuídos a mutações genéticas e histórico familiar, enquanto 20% a 30% dos casos são atribuídos a fatores modificáveis (Obeagu; Obeagu, 2024).

A predisposição genética é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (Geczik *et al.*, 2022). Mutações nos genes BRCA1 ou BRCA2 podem predispor um indivíduo a desenvolver tumores de mama, com um risco de até 70% ao longo da vida (Arun *et al.*, 2024). Além disso, aproximadamente 5 a 10% dos casos de câncer de mama são associados com histórico familiar, com impacto no grau e estágio do tumor (Liu *et al.*, 2021). Estima-se que cerca de 13% a 19% das mulheres diagnosticadas com a doença têm um parente de primeiro grau afetado, apresentando um aumento no risco de acordo com a quantidade de parentes diagnosticados (Shiyanbola *et al.*, 2017).

Fatores de risco modificáveis, como consumo de álcool, tabagismo, excesso de peso e atividade física, têm um papel fundamental no risco de desenvolvimento de câncer de mama (Cohen *et al.*, 2023). O alcoolismo, por meio de mecanismos de estresse oxidativo, desregulação da metilação do DNA e interação com o metabolismo retinóide, induz a carcinogênese mamária, além de estimular a invasão (Starek-Świechowicz; Budziszewska; Starek, 2022). O tabagismo, tanto ativo quanto passivo, aumenta o risco de câncer de mama ao causar mutações em oncogenes e supressores tumorais, como o p53 (Lukasiewicz *et al.*, 2021). O sobrepeso e obesidade também são considerados fatores de risco para a doença, uma vez que há produção excessiva de estrogênio no tecido adiposo, aumentando a propensão de desenvolvimento da doença (Lee *et al.*, 2019). Além desses fatores, um estilo de vida sedentário é associado a um risco aumentado de 15,5% da doença, por meio de mecanismos como resistência à insulina, inflamação sistêmica e desregulação de hormônios sexuais (Lee *et al.*, 2021).

Fatores hormonais e reprodutivos, devido à maior exposição a hormônios como o estrogênio, aumentam significativamente o risco de câncer de mama (Mao *et al.*, 2023). Alguns dos fatores incluem a menarca precoce, menopausa tardia, idade avançada no primeiro parto, menor paridade, menor duração de amamentação, terapia de reposição hormonal na menopausa e uso prolongado de anticoncepcionais orais (Hong; Xu, 2022). A exposição ao estrogênio desempenha um papel crítico na tumorigênese mamária, devido à ativação da transcrição de genes que promovem a proliferação celular e inibição da apoptose, aumentando a chance de mutações (Bonfiglio; Di Pietro, 2021). Além desses fatores, evidências recentes têm sugerido uma causa viral do câncer de mama, como a infecção pelo Vírus do Tumor Mamário do Camundongo (MMTV), o Vírus da Leucemia Bovina (BLV), Papilomavírus Humano

(HPV) e o Vírus Epstein-Barr (EBV) (Lawson; Salmons; Glenn, 2018).

2.2 Papilomavírus Humano (HPV)

O papilomavírus humano (HPV), vírus pertencente à família Papillomaviridae, é caracterizado como a infecção viral sexualmente transmissível mais comum no mundo, sendo associado ao desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres, como os cânceres cervical, vaginal, anal e de cabeça e pescoço (Kamolratanakul; Pitisuttithum, 2021). Atualmente, mais de 200 tipos de HPV foram caracterizados, capazes de induzir lesões específicas em epitélios cutâneos ou mucosos, ou originar verrugas benignas e carcinomas malignos (Bernard, 2005; Burk *et al.*, 2013).

Os diferentes genótipos do HPV são classificados em HPV de alto e baixo risco, dependendo de seu potencial carcinogênico. Os tipos de HPV de alto risco são, predominantemente, os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, associados ao desenvolvimento de diferentes cânceres, especialmente o cervical (Gebregzabher *et al.*, 2021). Os tipos de baixo risco são considerados não-malignos, causando lesões hiperproliferativas benignas, como verrugas anogenitais, papilomatose respiratória recorrente (RRP) e Epidermodisplasia Verruciforme, predominando os tipos 1, 2, 3, 6, 10, 11, 27, 42, 44, 57 e 70 (Egawa; Doorbar, 2017). A resposta imunológica do hospedeiro combate a infecção pelo HPV, eliminando cerca de 90% do vírus em 2 a 3 anos; contudo, cerca de 10% das infecções tornam-se crônicas e 1% evolui para lesões neoplásicas (Jain *et al.*, 2023).

Estima-se que cerca de 80% da população sexualmente ativa será infectada pelo HPV em algum momento da vida (Fredizzi; Levi, 2023). No Brasil, estima-se que 54,4% das mulheres e 41,6% dos homens estão infectados com o vírus, com a previsão de 700 mil novos casos de infecção a cada ano (Brasil, 2023). Globalmente, as cepas de HPV mais comuns que infectam mulheres são os HPVs 16, 52, 31 e 53; enquanto as cepas associadas com processos carcinogênicos mais incidentes são HPV 16 e 18 (Scott-Wittenborn; Fakhry, 2021). No Brasil, o tipo HPV16 é responsável por até 54,3% das infecções cervicais HPV-positivas (Ayres; Silva, 2010).

Composto por um DNA circular de fita dupla, o genoma do HPV, de aproximadamente 8kb, é organizado em três regiões funcionais: região longa de controle (LCR), região precoce (E) e região tardia (L) (Figura 3) (O'Connor *et al.*, 1995; Zur Hausen, 1996). A LCR regula a replicação e a transcrição de genes precoces (E)

e tardios (L), sendo essencial para o controle da expressão viral (Della Fera, 2021). A região precoce do HPV (E) é responsável por codificar seis proteínas virais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, relacionadas ao controle da transcrição, replicação viral e transformação celular (Tabela 2) (Bhattacharjee *et al.*, 2022; Favre; Ramoz; Orth, 1997). A expressão dos genes tardios, L1 e L2, está envolvida na ligação do vírus à superfície celular e encapsulação do genoma viral, induzindo a formação do vírion (Favre; Ramoz; Orth, 1997; Fernandes *et al.*, 2013).

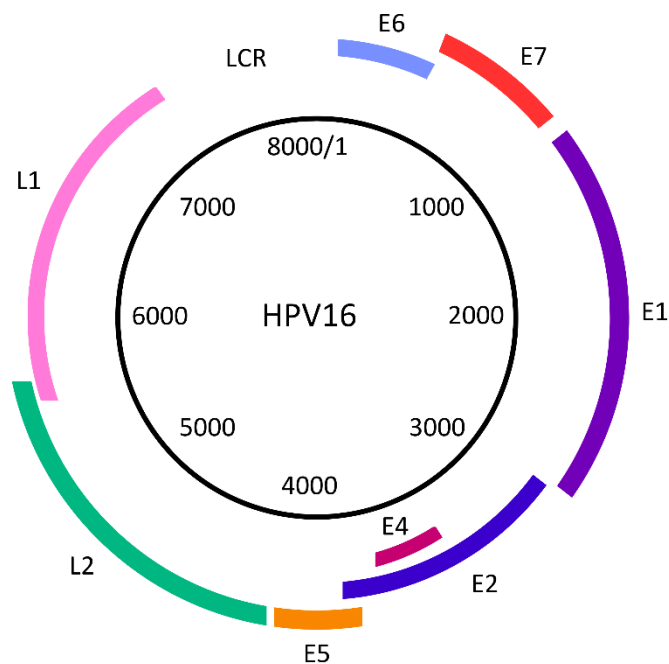


Figura 3: Genoma do Papilomavírus humano. Organização do genoma de HPV16, mostrando a região longa de controle (LCR) e as proteínas precoces e tardias. As proteínas precoces do HPV E1, E2, E4, E5, E6 e E7 estão mostradas nas cores roxa, azul escuro, rosa escuro, laranja, azul claro e vermelho respectivamente. As proteínas da região tardia, L1 e L2, estão de rosa e verde, respectivamente. Fonte: A Autora (2025).

Proteína	Função
E1	Atua na iniciação e no controle da replicação do DNA do HPV, funcionando como helicase, facilitando tanto a separação das cadeias de DNA, quanto o recrutamento de fatores de replicação.
E2	Regula a transcrição dos genes virais e replicação do genoma viral. Responsável pela distribuição de genomas virais durante o processo de mitose.
E4	Responsável pelo efeito citopático nas células hospedeiras, favorecendo a liberação de vírions. É expressa na fase posterior do processo de replicação, podendo promover a parada no ciclo celular na fase G2.
E5	Atua na transformação celular, tumorigênese e proliferação celular. Contribui para a evasão da resposta imune, além de promover a angiogênese e modular a

	atividade de E6 e E7.
E6	Promove proliferação celular, metástase, instabilidade genômica, inibição da apoptose, parada do ciclo celular. Degrada o p53, supressor tumoral, favorecendo a carcinogênese.
E7	Promove imortalidade replicativa, invasão, metástase, evasão imunológica, e instabilidade genômica. Inativa a pRB para progressão tumoral.

Tabela 2: Apresentação das principais funções das proteínas precoces presentes no genoma do HPV.

2.2.1 Infecção e carcinogênese

A infecção do HPV começa com a entrada do vírus nas células basais, facilitada pela interação das proteínas do capsídeo (L1 e L2) com receptores de superfície celular, como sulfato de heparina (Yousefi *et al.*, 2022; Burd; Dean, 2016). No núcleo, E2 se liga à proteína E1, formando um heterodímero, dando início à replicação e transcrição viral (Doorbar, 2005). Durante a integração do vírus ao genoma do hospedeiro, ocorre a perda de parte de E2 levando à expressão desregulada das proteínas E6 e E7, potencialmente favorecendo a malignização celular (Bhattacharjee *et al.*, 2022). Posteriormente, as proteínas E4, E5, E6 e E7 passam a ser expressas, criando um ambiente propício para infecção e replicação viral, além da evasão imunológica (Gutiérrez-Hoya; Soto-Cruz, 2020). A proteína E4 é responsável por romper os filamentos de citoqueratina, afetando a estabilidade mecânica das células, tornando-as frágeis e mais propensas à liberação das partículas virais (Graham, 2010; Doorbar, 2005). A proteína E5 atua como reguladora da apoptose, além de estimular a proliferação celular através da ativação do fator de crescimento epidermal (EGF) e favorecer a evasão da resposta imunológica (Ashrafi *et al.*, 2006; DiMaio; Petti, 2013). As oncoproteínas E6 e E7 são consideradas as mais importantes para a carcinogênese HPV-associada, responsáveis ativar vias oncogênicas e reprimir as vias de supressão tumoral (Hatano *et al.*, 2017). E6 inibe a apoptose e possíveis reparos no DNA ao promover ubiquitinação e degradação do supressor tumoral p53 (Stubenrauch; Laimins, 1999). A oncoproteína E7 promove a degradação de pRB p107 e p130, liberando o fator de transcrição E2F promovendo a proliferação celular aberrante (Graham, 2017). Por fim, os vírions são liberados na superfície celular, permitindo a infecção de novos locais (Figura 4) (Burk *et al.*, 2013).

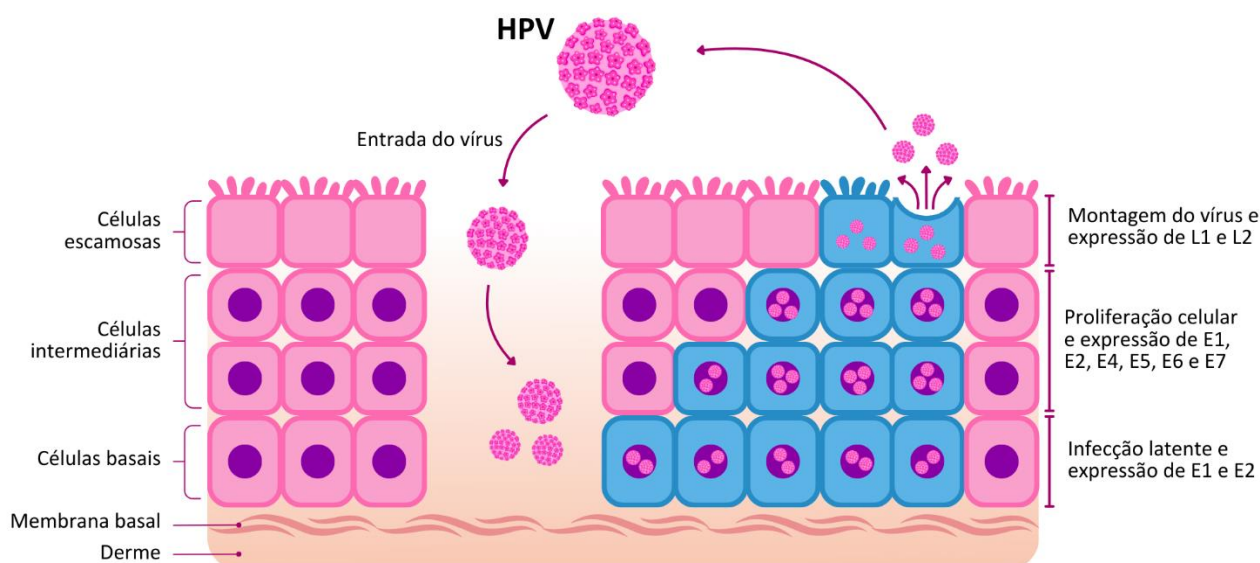


Figura 4: Ciclo de replicação do HPV. Inicialmente, ocorre a entrada do vírus através de microlesões no tecido e permanece latente no interior das células basais, com baixa taxa de proliferação. Posteriormente, há um aumento na taxa proliferativa e atuação das proteínas precoces. Os vírus são montados e, por fim, os vírions são secretados pelos queratinócitos. Fonte: A Autora (2025).

Uma pequena porcentagem dos indivíduos infectados com o HPV desenvolve uma infecção persistente, aumentando o risco de progressão ao câncer, com o desenvolvimento de lesões precursoras de alto grau e invasão (Stanley; Pett; Coleman, 2007). O tipo 16 do HPV possui uma alta capacidade persistir e induzir a malignidade das lesões, por meio, principalmente, da atividade das proteínas virais E5, E6 e E7, levando ao aumento da instabilidade genômica, acúmulo de mutações oncogênicas, perda do controle do crescimento celular e, por fim, câncer (Muñoz *et al.*, 2006; Yu; Majerciak; Zheng, 2022).

2.2.2 Câncer de mama e infecção pelo HPV

Estudos têm revelado que a infecção pelo HPV pode exercer um papel fundamental no desenvolvimento da neoplasia mamária, entretanto, as evidências existentes na literatura permanecem conflitantes (Purrahman *et al.*, 2022). A detecção do DNA do HPV em amostras de câncer foi relatada pela primeira vez em 1992, quando um estudo relacionou a capacidade do vírus em imortalizar células epiteliais à carcinogênese mamária (Di Lonardo; Venuti; Marcante, 1992). Desde então, a prevalência do vírus em tecidos de câncer de mama tem sido relatada em diversos

estudos, atingindo até 86% dos pacientes, com destaque aos genótipos de alto risco 16 e 18 (De Carolis *et al.*, 2019; Kroupis *et al.*, 2006). Na região nordeste do país, estudos mostram que o HPV do tipo 16 é o mais frequente em amostras de tumores de mama, detectado em 44.6% dos pacientes (Da Mota Nunes *et al.*, 2024).

A transmissão do HPV para o tecido mamário é desconhecida, sendo alvo de diversos estudos que sugerem possíveis mecanismos (Figura 5). A circulação sanguínea e o sistema linfático são considerados possíveis meios de transporte do vírus, principalmente em pacientes com diagnóstico de HPV cervical (Hennig *et al.*, 1999; Khammapirad *et al.*, 2011). Além disso, pesquisas sugerem que microlesões nos mamilos ou na aréola podem facilitar a infecção, que pode ocorrer durante atividades sexuais oral ou genital na mama (Wang *et al.*, 2011).

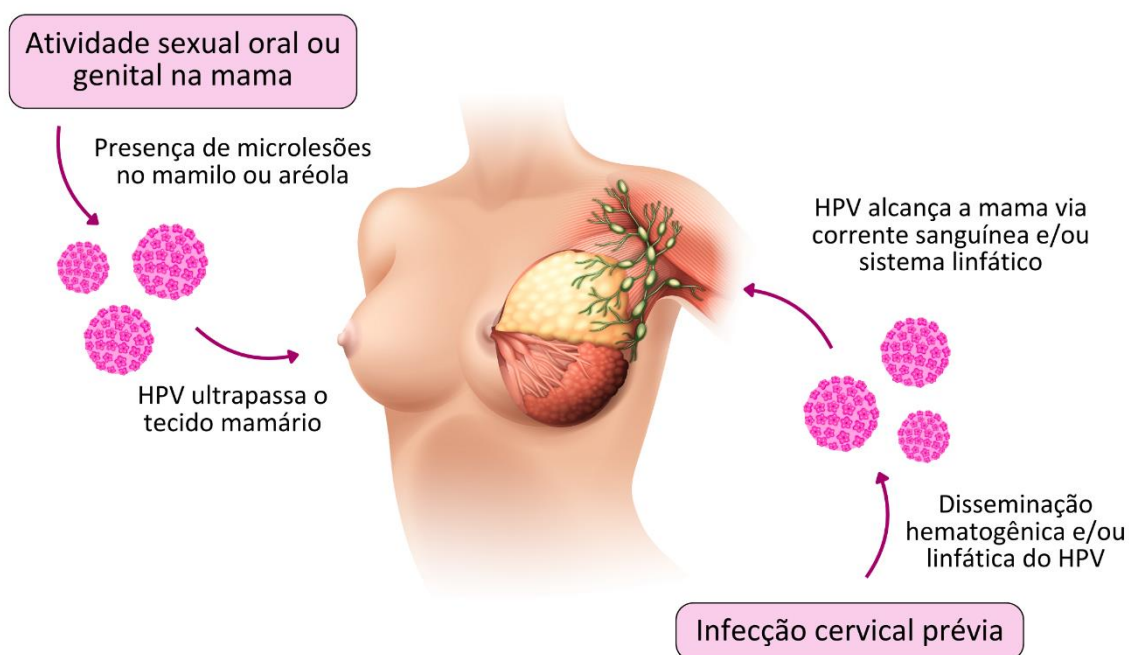


Figura 5: Mecanismo potencial para a transmissão do HPV para o tecido mamário. Duas hipóteses são apresentadas: transmissão sexual, por contato sexual ou genital com o seio; e disseminação hematogênica e/ou linfática, na qual o HPV ultrapassa o sítio original (infecção cervical) atingindo o tecido mamário. Fonte: A Autora (2025).

A teoria conhecida como "*hit and run*" propõe que o HPV pode promover a tumorigênese e não estar presente nas células tumorais no momento do diagnóstico, o que justificaria a variação na detecção do vírus entre os estudos (Balci; Uras; Feldman, 2019). Embora a correlação ainda não seja estabelecida, o HPV é sugerido como um possível agente causa-efetivo ou co-participante na carcinogênese

mamária, promovendo a superexpressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias celulares (Usman *et al.*, 2022). Em pacientes com câncer de mama HPV-positivo foi observada a superexpressão de IL-6, citocina associada à progressão tumoral e sobrevivência celular (Charostad *et al.*, 2021). A presença dos oncogenes E6 e E7 do HPV demonstrou uma maior ativação de HER2 e diminuição da expressão de p53 e pRB, supressores tumorais, favorecendo a carcinogênese mamária e metástase (Yasmeen *et al.*, 2007; Khodabandehlou *et al.*, 2019).

2.3 Microambiente tumoral

O microambiente tumoral (TME – do inglês, *Tumor Microenvironment*) é uma estrutura heterogênea, dinâmica e complexa, composta pelas células tumorais, células estromais, como fibroblastos, células imunológicas (Linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, células Natural Killers e neutrófilos) e endoteliais, além de matriz extracelular (Figura 6) (Bejarano; Jordão; Joyce, 2021). Envolvido por vasos sanguíneos e linfáticos, o TME é rico em citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, sendo responsável pela promoção do crescimento e desenvolvimento tumoral (Hinshaw; Shevde, 2019). A hipóxia observada no TME, resultante da vasculatura descontínua e da drenagem linfática anormal, favorece a ativação de fatores pró-tumorais e promove a acidificação do ambiente, levando à diminuição da resposta imune e terapêutica e à metastatização (Jing *et al.*, 2019).

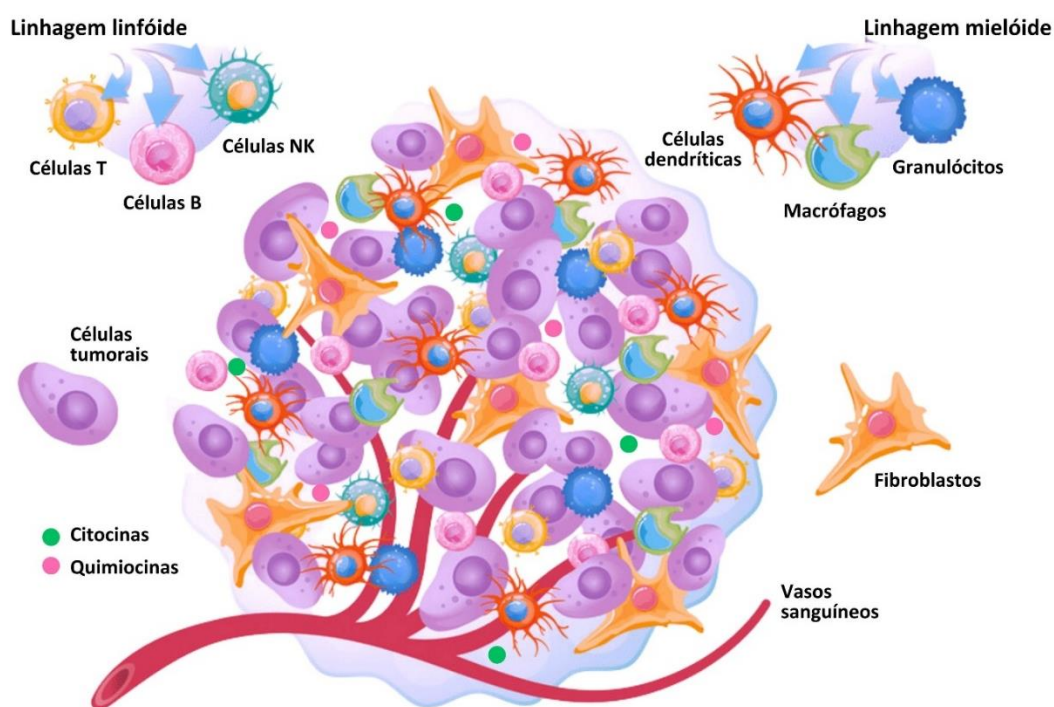


Figura 6: Componentes do microambiente tumoral. O microambiente tumoral é uma estrutura heterogênea composta pelas células tumorais, células estromais, como fibroblastos, células imunológicas e rico em citocinas e quimiocinas. Fonte: Adaptado de Zhang e Veeramachaneni, 2022.

A primeira imunidade a atuar é a inata, composta por células granulocíticas e monocíticas, associadas à fagocitose, liberação de quimiocinas e citocinas, e mediação da inflamação, resultando no favorecimento do desenvolvimento tumoral (Altorki *et al.*, 2018). As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos (APCs) responsáveis por ativar a imunidade adaptativa ao capturar e apresentar antígenos, incluindo tumorais, às células T (Ma *et al.*, 2013). Entretanto, a função das DCs pode ser inibida ou induzida a um papel pró-tumoral no TME, uma vez que há a liberação de mediadores que inibem a resposta antitumoral, favorecendo a evasão imune (Altorki *et al.*, 2018). Os neutrófilos associados ao tumor (TANs) podem apresentar um papel antitumoral ou pró-tumoral, influenciando processos como inflamação crônica, angiogênese e metástase (Wu; Saxena; Singh, 2020; Altorki *et al.*, 2018). As células Natural Killer (NK), por sua vez, são fundamentais na resposta imune antitumoral, atuando no reconhecimento e lise das células tumorais, além de secretar citocinas pró-inflamatórias (Cruvinel *et al.*, 2010). Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) desempenham papéis cruciais no microambiente tumoral, categorizados em M1, de caráter pró-inflamatório e antitumoral, e M2, imunossupressores e pró-tumorais (Lechien *et al.*, 2020). No TME, há um estímulo

pela IL-4 à expressão de um perfil M2, contribuindo tanto para a progressão tumoral quanto para a metástase, sendo, portanto, associado a piores prognósticos em tumores sólidos (Zhao *et al.*, 2017).

A resposta imune adaptativa requer a ativação dos linfócitos B e T e da liberação das moléculas produzidas por eles, cuja principal função consiste na especificidade e diversidade de reconhecimento e memória imunológica (Abbott; Ustoyev, 2019; Saab *et al.*, 2020). Os linfócitos B desempenham um papel essencial na imunidade antitumoral, contribuindo tanto para respostas inatas quanto adaptativas, estando associados aos melhores prognósticos em diferentes tipos de câncer (Laumont; Nelson, 2023). As células T podem ser classificadas quanto ao marcador de superfície, T CD4+ e T CD8+, e quanto à função, citotóxicos (CTLs), auxiliares (Th), reguladoras (Treg) e de memória (Sun *et al.*, 2023). Os diferentes subtipos de células T CD4+ auxiliares (Th), como Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 e Treg, apresentam respostas específicas moduladas por citocinas e influenciam o prognóstico de pacientes com câncer de maneiras variadas (Saillard *et al.*, 2021).

As células T CD4+ diferenciam-se em subtipos especializados, como Th1, Th2, Th17 e Th22, mediadas por vias de sinalização específicas, desempenhando papéis cruciais na regulação da resposta imunológica (Figura 7). As células Th1 desempenham uma função antitumoral fundamental, regulando as CTLs, ativando APCs e eliminando diretamente células tumorais por meio de citocinas que ativam a apoptose (Knutson; Disis, 2005). A diferenciação de células Th1 é mediada pela sinalização da IL-12, que ativa JAK2 e TYK2, com a ativação de STAT4 desempenhando um papel crucial na regulação de genes associados à resposta Th1 (Seif *et al.*, 2017). A ativação de STAT6, induzida pela IL-4, promove a regulação positiva de GATA3, fundamental na diferenciação e a polarização das células Th2, que desempenham um papel antitumoral ao recrutar e ativar eosinófilos, modulando a resposta imune inata para combater o tumor (Butcher; Zhu, 2021; Knutson; Disis, 2005). As células Th17 desempenham um papel importante no câncer, especialmente no câncer de mama, uma vez que suas citocinas secretadas estão associadas ao crescimento, proliferação e invasão de células tumorais (Karpisheh *et al.*, 2022). STAT3 é essencial para a diferenciação de células Th17, pois induz a expressão de Receptor Órfão Relacionado ao Ácido Retinoico Gama T (RORγt), que, em cooperação com STAT3, promove a produção da citocina IL-17, característica dessas células (Seif *et al.*, 2017). As células Th22 também tem a capacidade de promover a

tumorigênese em alguns tipos de câncer, visto que foi demonstrado que estavam mais presentes à medida que o estágio do tumor avançou (Saillard *et al.*, 2021). FOXO4 é um fator de transcrição associado às células Th22, ao regular diretamente a secreção de IL-22, favorecendo a diferenciação celular (Atenhan, 2018).

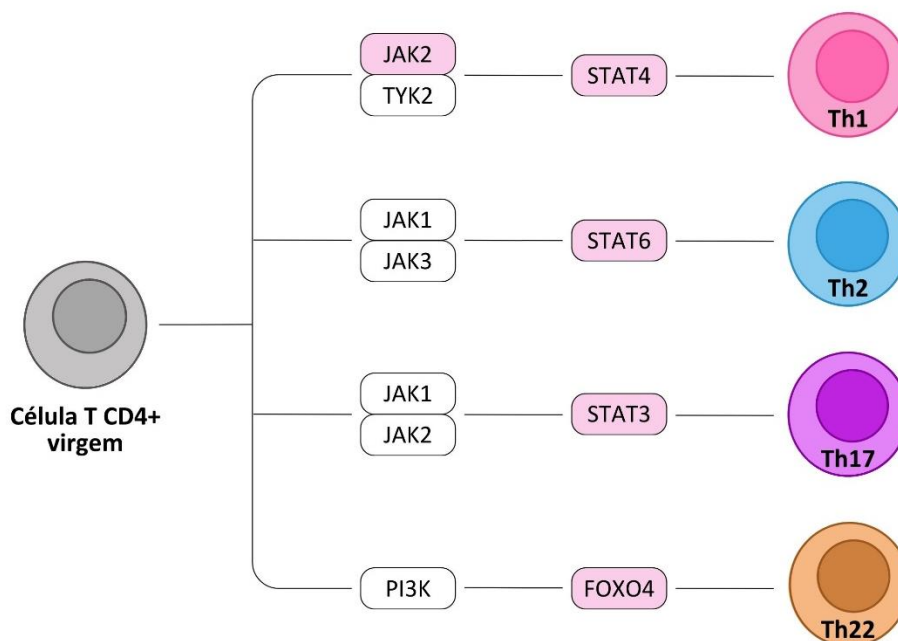


Figura 7: Diferenciação de células T CD4+ virgens em subtipos efetores Th1, Th2, Th17 e Th22, mediada por vias de sinalização específicas. As caixas destacadas em rosa (JAK2, STAT4, STAT6, STAT3 e FOXO4) representam os marcadores moleculares analisados no trabalho. Fonte: A Autora (2025).

As quimiocinas têm a função de recrutamento de células inflamatórias, particularmente de leucócitos, durante a inflamação (Kufareva; Salanga; Handel, 2015). Essas moléculas são divididas em quatro subfamílias: CC, CXC, CX3C e XC, podendo ser consideradas pró-inflamatórias ou homeostáticas (Hughes; Nibbs, 2018; Palomino; Marti, 2015). No TME, as quimiocinas atuam sobre células tumorais e estromais, influenciando processos como angiogênese, proliferação celular e sobrevivência do tumor (Nagarsheth; Wicha; Zou, 2017). As citocinas são moléculas sinalizadoras que desempenham um papel significativo na iniciação tumoral, expansão, progressão, formação de metástases, promoção da angiogênese e no desenvolvimento de resistência a terapias (Pradhan; Kundu; Kundu, 2024). As principais citocinas pró-inflamatórias incluem interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF α); em contraste, as principais citocinas anti-inflamatórias incluem IL-12 e IL-10 (Turner *et al.*, 2014). Ao serem liberadas por períodos

prolongados, as citocinas podem induzir uma inflamação crônica, contribuindo para o desenvolvimento de tumores (Nengroo; Verma; Datta, 2022).

2.3.1 Microambiente tumoral na presença do HPV

Pesquisas sugerem o HPV altera o TME ao promover alterações em células normais, favorecendo a imunossupressão, a persistência viral e proliferação celular desordenada, contribuindo para o desenvolvimento da neoplasia cervical (Yuan *et al.*, 2021). O TME na presença do HPV inicia com uma série de respostas imunológicas contra a infecção, iniciando nos queratinócitos, que atuam como APCs inespecíficas. Durante a infecção, essas células podem apresentar peptídeos virais em moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHC-1) (Lebre *et al.*, 2007; Nasu; Narahara, 2010).

Ocorre, ainda, a síntese de citocinas como IFN-1, TNF- α , IL-18 e quimiocinas, como CCL2, CCL20 e CXCL9; essas moléculas, por sua vez, recrutam e ativam células imunológicas, incluindo células NK, linfócitos T CD4+ e CD8+, macrófagos e DCs (Nasu; Narahara, 2010). As APCs capturam e apresentam antígenos do HPV às células T, promovendo a ativação de células T e B, resultando na produção de anticorpos (Manzo-Merino *et al.*, 2020; Amador-Molina *et al.*, 2013). Durante a progressão das lesões cervicais, observa-se um aumento no número de macrófagos, com predominância dos macrófagos M2, que promovem a diferenciação de células T virgens em células Treg por meio da liberação de IL-10, contribuindo para a expansão tumoral (Hammes *et al.*, 2007; Lepique *et al.*, 2009; Bolpetti *et al.*, 2010).

A progressão do HPV e atividade dos oncogenes E6 e E7 está associada à regulação negativa do receptor TLR9, prejudicando a resposta imune inata (Hasan *et al.*, 2007). Em infecções virais, há uma indução da resposta Th1, no entanto, em pacientes com lesões intraepiteliais ou invasivas HPV-positivas, observa-se um predomínio do perfil Th2, que suprime a imunidade celular e favorece a progressão das lesões, permitindo a persistência do HPV e a carcinogênese (Clerici *et al.*, 1997; Peghini *et al.*, 2012). Além disso, níveis mais baixos de IL-2 e TNF- α , ativadoras do padrão Th1, foram observadas em lesões de HPV em comparação com amostras saudáveis (Peghini *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2008).

2.3.2 Microambiente tumoral no câncer de mama

O microambiente do câncer de mama pode ser analisado em três regiões: local, regional e distante, composto por diferentes tipos celulares, como fibroblastos, leucócitos, adipócitos e células mioepiteliais e endoteliais, além de componentes como a matriz extracelular, citocinas, hormônios, fatores de crescimento (Arneth *et al.*, 2019). Nas últimas décadas, os componentes do microambiente tumoral têm sido apontados como cruciais na regulação do crescimento, diferenciação e comportamento invasivo das células epiteliais mamárias normais e cancerígenas (Allinen *et al.*, 2004).

No microambiente do câncer de mama, DCs possuem papel central na ativação de respostas antitumorais, mas podem ser polarizadas pelo tumor para um fenótipo imunossupressor, limitando a atividade das células T e favorecendo a progressão tumoral (Cunha, 2014). No que se refere aos neutrófilos, os TANs são recrutados por quimiocinas como CXCR2 e apresentam um papel pró-tumorigênico, estando associados à progressão tumoral, resistência à quimioterapia e menor sobrevida global (Wu *et al.*, 2020). Os TAMs, por sua vez, desempenham um papel pró-tumoral no câncer de mama, sendo recrutados por citocinas como CCL2 e CCL5, que promovem metástase, progressão da doença e alteram sua funcionalidade para apoiar o crescimento tumoral e o microambiente metastático (Mehta *et al.*, 2021).

A polarização dos macrófagos no câncer de mama é mediada por fatores secretados pelas células tumorais, como o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), que modulam a diferenciação em direção ao fenótipo M2 (Sousa *et al.*, 2015). Um estudo do transcriptoma de células de câncer de mama observou que os macrófagos M1 estão associados a um enriquecimento de conjuntos de genes relacionados à proliferação celular e ao ciclo celular, relacionados a características tumorais agressivas; os M2 foram correlacionados à progressão tumoral e à imunossupressão, contribuindo para um fenótipo pró-tumoral (Oshi *et al.*, 2020).

A densidade de linfócitos B infiltrantes é aumentada no câncer de mama em comparação com os tecidos mamários normais, produzindo citocinas e imunoglobulinas, desempenhando papéis importantes na imunidade antitumoral (Garaud *et al.*, 2019). Altos números de linfócitos B no câncer de mama têm sido associados a um prognóstico favorável, sugerindo que as células B, como parte da resposta imune adaptativa, podem desempenhar um papel protetor (Mahmoud *et al.*, 2012). No câncer de mama, os linfócitos T representam 75% dos linfócitos, geralmente

associados a um bom prognóstico, podendo apresentar, no entanto, efeitos pró-tumorais ou antitumorais (Nelson *et al.*, 2021). Foi demonstrado que as células Th1 desempenham um papel crucial na resposta imunológica contra o câncer de mama, visto que promovem a expansão de células T citotóxicas específicas para o tumor e modulam o microambiente tumoral, favorecendo a destruição das células tumorais (Disis; Park, 2009).

Com relação à Th2 no câncer de mama, sua alta expressão de células está associada a características altamente proliferativas, com um aumento de células pró-tumorais, como macrófagos M2 (Tokumaru *et al.*, 2020). As células Th17 são altamente expressas em tumores māmarios, secretando citocinas inflamatórias como IL-17, TNF- α , IL-21 e IL-6, viabilizando, assim, um microambiente que favorece o crescimento, proliferação e invasão de células tumorais (Karpisheh *et al.*, 2022). As células Th22, que secretam a citocina IL-22, estão positivamente correlacionadas com o estágio e prognóstico do câncer de mama, dado que a IL-22 ativa vias de sinalização como JAK/STAT3, MAPK e Akt, promovendo a tumorigênese e a proliferação de células tumorais (Peng *et al.*, 2023).

As quimiocinas desempenham papéis diretos e indiretos na progressão tumoral, ao recrutarem leucócitos para o TME e ao promoverem alterações no metabolismo celular, como aumento da glicólise e produção de ATP, favorecendo a proliferação tumoral (Gao; Fish, 2018). Foi relatado que os níveis de expressão de CCL5 e 19 e CXCL9 em amostras de câncer de mama foram aumentados em comparação com amostras normais, demonstrando um papel favorável para prognóstico e sobrevida livre de recidiva dos pacientes (Hozhabri *et al.*, 2022). As citocinas, por sua vez, desempenham um papel essencial no TME, mediando a inflamação que pode promover a iniciação e metástase do tumor (Kawaguchi *et al.*, 2019). Estudos relatam que citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-12, TNF α , IL-6 e IFN γ têm sua expressão aumentada em tumores de mama, favorecendo a disseminação de células tumorais (Vilsmaier *et al.*, 2016; Semesiuk *et al.*, 2013). Foi demonstrada uma correlação positiva entre os níveis de IL-6 e a progressão da doença e metástase ao ativar a via IL-6/JAK/STAT3, sugerindo um papel como um marcador prognóstico negativo (Méndez-García *et al.*, 2019). A IL-17, por outro lado, favorece a metástase do câncer de mama ao induzir a produção de IL-6 e CCL20 em células tumorais metastáticas, favorecendo o recrutamento e a diferenciação de células Th17 (Benevides *et al.*, 2015).

2.4 Marcadores moleculares para estudo do microambiente tumoral

Marcadores moleculares podem ser alterações em sequências genéticas, níveis de expressão ou na função de proteínas, sendo úteis para a detecção precoce do câncer, a determinação do prognóstico e o monitoramento da progressão da doença (Sidransky, 2002). Nos cânceres, como o câncer de mama, a utilização de marcadores moleculares para análises de expressão gênica fornece dados abrangentes a respeito do comportamento do câncer, auxiliando na compreensão do papel do microambiente tumoral (Allinen et al., 2004).

A via de sinalização JAK/STAT é considerada uma das vias celulares mais importantes, responsáveis por diversas funções, como hematopoiese, manutenção de células-tronco, resposta imunológica, reparo tecidual, apoptose, adipogênese e processos inflamatórios (Hu et al., 2021). A sinalização JAK-STAT tem sido apontada como essencial para a progressão do câncer, atuando como estimulador do crescimento e metástase tumoral e modulador da vigilância imunológica, sendo ativada de forma constitutiva pela expressão elevada de citocinas (Figura 8) (Brooks; Putoczki, 2020). Estruturalmente, essa via é composta por receptores transmembrana, quinases de tirosina citosólicas associadas a esses receptores (as JAKs) e os transdutores de sinal e ativadores da transcrição (os STATs) (Meraz *et al.*, 1996).

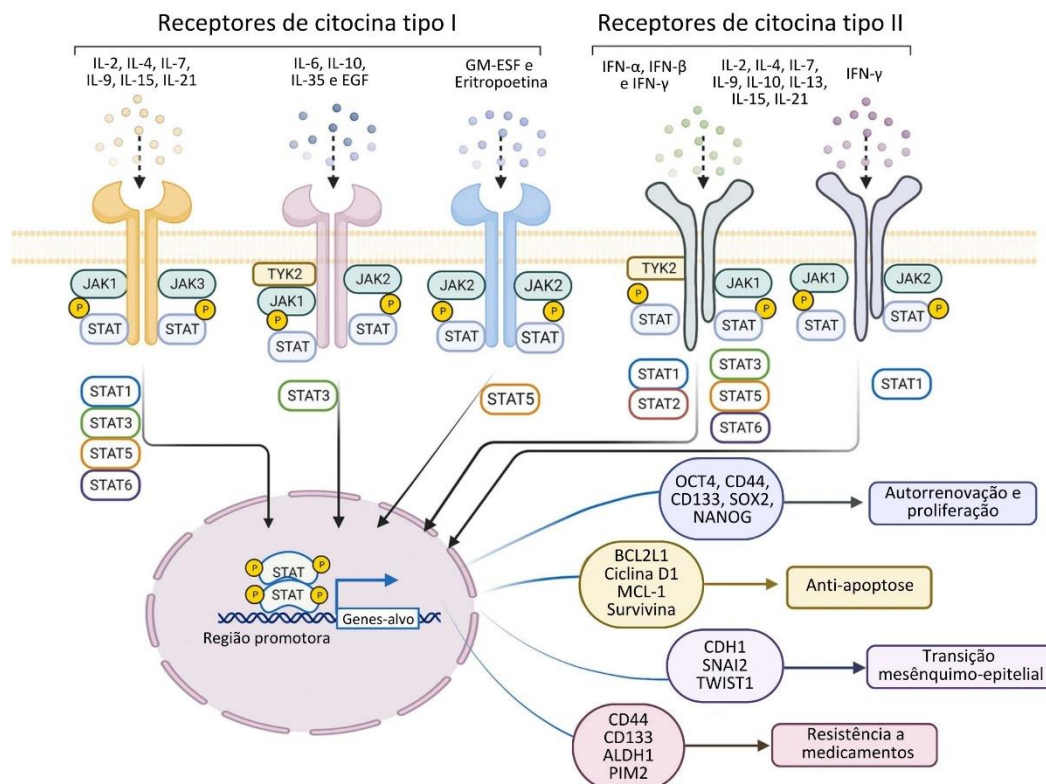


Figura 8: Visão geral da sinalização JAK–STAT na regulação da tumorigênese. Ao se ligarem aos receptores, as citocinas tipo I e II transduzem sinais intracelulares por meio da via JAK-STAT. Os domínios citoplasmáticos dos receptores de citocinas estão associados a vários JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2), que atuam por meio da autofosforilação e fosforilação de STATs. Fonte: Adaptado de Zhu et al., 2023.

A família de proteínas Janus quinase (JAK) é formada por quatro membros: JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 (Yamaoka *et al.*, 2004). Essas proteínas interagem de maneira específica com receptores de citocinas, ativando os STATs correspondentes, que desempenham funções biológicas específicas (Schindler; Darnell, 1995; DiSanto, 1997). Enquanto JAK1, JAK3 e TYK2 estão envolvidos principalmente no desenvolvimento e na regulação do sistema imunológico, JAK2 desempenha um papel essencial na hematopoiese (Xue *et al.*, 2023). Em diferentes estudos, a tumorigênese está associada ao aumento da atividade de JAK2, e o bloqueio funcional de JAK2 tem efeito protetor contra o surgimento de diferentes tumores (Sakamoto *et al.*, 2009; He; Zhang, 2010; Agrawal *et al.*, 2010). Outros estudos evidenciaram que o JAK2 do tipo selvagem é regulado positivamente em cânceres gástricos primários, e a regulação negativa de JAK2 suprime significativamente a proliferação de células de câncer gástrico, sugerindo que JAK2 pode desempenhar um papel fundamental na carcinogênese gástrica (Ding *et al.*, 2010). A superexpressão de JAK2 está

relacionada com tumores sólidos, incluindo carcinoma gástrico, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Lee *et al.*, 2006; Fuke *et al.*, 2007; Hedvat *et al.*, 2009; Kupferman *et al.*, 2009).

A família dos transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs) é composta por sete proteínas: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b e STAT6. Essas proteínas desempenham papéis fundamentais na regulação da expressão gênica, influenciando processos como diferenciação celular, sobrevivência e apoptose (Darnell, 1994). A STAT1 atua na mediação da sinalização de interferons (IFNs), estimulando efeitos antivirais e imunológicos/inflamatórios (Meraz, 1996; Durbin, 1996). Já STAT2 é ativado exclusivamente por IFN- α , β e λ , sendo essencial para a resposta antiviral (Sheppard, 2003; Park, 2000). STAT3 apresenta uma função pleiotrópica, sendo ativado por citocinas como IL-6, IL-10 e IFN- α/β , contribuindo para apoptose e sobrevivência celular (Takeda, 1997). Sua ativação constitutiva foi identificada em células cancerígenas humanas, sugerindo um papel causal na oncogênese (Bromberg, 1999). STAT3 é frequentemente superativado no câncer de mama e correlacionado à pior sobrevida e maior risco de metástase, enquanto STAT1 tem papel antitumoral (Furth *et al.*, 2014; Koromilas; Sexl, 2013). STAT4 é ativado por IFN- α em células humanas, desempenhando um papel importante na diferenciação de células Th1 (Farrar, 2000).

Em estudos com camundongos deficientes em STAT4 foi observado que eles apresentaram resposta imunológica Th1 prejudicada, incluindo menor produção de IFN- γ (Kaplan; Wurster; Grusby, 1998). Por outro lado, camundongos são mais resistentes a doenças autoimunes dependentes de Th1, evidenciando o papel do STAT4 em processos inflamatórios e autoimunes (Cua, 2003). STAT5 é ativado por muitas proteínas, incluindo hormônios do crescimento, prolactina, IL-2 e IL-7, sendo essencial para a regulação da hematopoiese e do sistema imunológico (Teglund, 1998). STAT6 é ativado principalmente por IL-4 e IL-13, desempenhando papel essencial nas respostas imunes do tipo Th2 (Takeda, 1996). A ativação STAT6 induz a transcrição de genes relacionados a produção de IgE e à diferenciação de células Th2; sua ausência leva a respostas Th2 defeituosas, com redução na produção de IgE e na diferenciação celular mediada por IL-4 (Shimoda, 1996).

Os fatores de transcrição *forkhead* da classe O (FOXOs) são representados por quatro membros: FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6, cuja expressão está presente na maioria dos tecidos (Wang; Zhou; Graves, 2014). Os FOXOs são

responsáveis pela regulação de diversos genes relacionados a processos essenciais como apoptose, ciclo celular e homeostase celular (Sun *et al.*, 2021). As proteínas FOXO têm funções essenciais em várias células, incluindo a regulação da resposta imune. Um exemplo é a participação do FOXO4, juntamente com BNC2, na diferenciação das células Th22, evidenciando sua relevância no sistema imunológico (Plank *et al.*, 2017).

A desregulação do FOXO4 está fortemente associada à progressão de diferentes tipos de câncer, além de processos de senescência e outras doenças (Liu; Li; Luo, 2019). No câncer, FOXO4 tem uma função como supressor tumoral, desempenhando um papel crucial na inibição do desenvolvimento e da progressão tumoral (Sun *et al.*, 2023). Estudos recentes reforçam a associação do FOXO4 no desenvolvimento de leucemias, câncer gástrico, câncer colorretal, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, câncer cervical, câncer de mama, câncer de pulmão, entre outros (Jiang *et al.*, 2018). Em camundongos transplantados com células de câncer de mama HER2-positivas, a ativação constitutiva de FOXO4 foi capaz de reduzir significativamente o início, o tamanho e a progressão de tumores (Wang *et al.*, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os perfis de expressão dos fatores de transcrição associados ao microambiente tumoral (STAT4, JAK2, STAT6, STAT3 e FOXO4) do câncer de mama em células mamárias infectadas com o Papilomavírus Humano (HPV) em um modelo experimental *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transfectar a linhagem celular MDA-MB-231 com os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV.
- Investigar os efeitos da presença de HPV na expressão dos fatores de transcrição associados ao microambiente do câncer de mama.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES

Os vetores contendo as oncoproteínas E5, E6 e E7 foram construídos a partir do gene selvagem do HPV 16, baseadas na sequência depositada no GenBank (K02718.1). Cada oncogene foi clonado no vetor de passagem pGEM-T (Promega®) utilizando sítios de restrição específicos e, posteriormente, subclonados dentro do vetor de expressão de mamíferos pcDNA3.1 para cada oncogene – pcDNA3.1E5, pcDNA3.1E6 e pcDNA3.1E7. Após a confirmação da clonagem, o DNA dos vetores recombinantes foi isolado pelo kit Plus Maxi (Qiagen) conforme instruções do fabricante.

4.2 CULTIVO E TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS

A linhagem celular MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) é uma linhagem epitelial de câncer de mama humano, derivada da metástase de adenocarcinoma mamário do subtipo triplo negativo. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em placa de cultura de células de 48 poços em 1mL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM – Invitrogen®) acrescido de 10% de soro bovino fetal (Gibco®) suplementado com 1% de penicilina/streptomina e incubado a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após o cultivo, 250ng/ul dos vetores construídos foram transfectados, separadamente, na linhagem celular, utilizando Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher), seguindo o protocolo do fabricante (Figura 9).

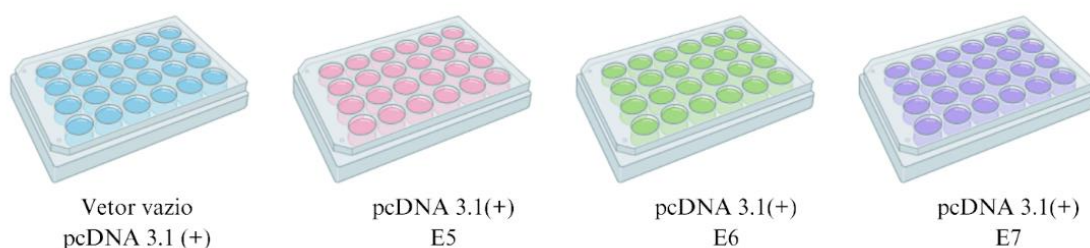


Figura 9: Grupos de transfecção: MDA cultivado com pcDNA 3.1 (vetor vazio); MDA transfectado com o oncogene E5; MDA transfectado com o oncogene E6; MDA transfectado com o oncogene E7. Fonte: A Autora (2025).

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E CONFIRMAÇÃO DA TRANSFEÇÃO

O RNA foi extraído da linhagem celular de mama cultivada para expressar os oncogenes do HPV. Para a extração do RNA, foi utilizado o Pure Link – RNA mini Kit (Invitrogen®), com intuito de isolar e purificar o RNA em uma concentração de 1000ng. A quantidade e qualidade do RNA isolado foram avaliadas através da visualização de bandas de RNA ribossômico em eletroforese em gel de agarose e uso de Nanodrop (Thermo Scientific®), considerando as razões 260/280. Posteriormente, a síntese de cDNA foi realizada seguindo o manual do kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Scientific®).

A confirmação da transfeção foi realizada a partir da constatação da expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 por RT-qPCR. As reações foram realizadas no termociclador LineGene9660 (Bioer), utilizando SYBR green com GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), utilizando *primers* específicos para E5 (Forward: ACT GGC GTG CTT TTT GCT TTG e Reverse: GAC ACA GAC AAA AGC AGC GG), E6 (Forward: GAG AAA CTG CAA TGT TTC AGG ACC e Reverse: TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCT GTG C) e E7 (Forward: AGC TCA GAG GAG GAG GAT GA e Reverse: GAG AAC AGA TGG GGC ACA CA). Para calcular a expressão relativa dos genes alvo, eles foram analisados em conjunto com os genes de referência beta actina (ACTB) (Forward: AAGAGAGGCATCCTCACCT e Reverse: TACATGGCTGGGGTGTGAA) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Forward: GAAGGTGGGGCTCATTTG e Reverse: TTAAAAGCAGCCGCCCTGGTG). O $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi calculado para analisar a expressão relativa de cada oncogene em comparação com os genes endógenos (ACTB e GAPDH) e comparado com a expressão dos oncogenes na linhagem celular C3 (célula de colo uterino HPV16 positiva).

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS AO TME

A avaliação da expressão de fatores de transcrição associados ao microambiente do câncer de mama, STAT4, JAK2, STAT6, STAT3 e FOXO4, utilizando *primers* específicos (Tabela 3), foi realizada no termociclador CFX Opus 96 Real-Time PCR Sytem (BioRad), utilizando SYBR green com GoTaq qPCR Master Mix, que envolve a visualização da amplificação dos genes escolhidos por meio de

um intercalante de DNA de fita dupla, obedecendo às diretrizes condicionais do MIQE (Bustin; Wittwer 2017. Os genes de referência utilizados para normalização de dados foram GAPDH) e Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa 1 (EF1A1). As reações foram realizadas em quintuplicatas biológicas e duplicatas técnicas no intuito de garantir a confiabilidade dos resultados.

Alvo	Sequência	T.a.
EF1A1 F	GTTGCGGTGGGTGTCATCA	60°C
EF1A1 R	GAGTGGGGTGGCAGGTATT	60°C
GAPDH F	GAAGGTGGGGCTCATTTG	60°C
GAPDH R	TTAAAAGCAGCCCTGGTG	60°C
STAT4 F	CCTGGGTGGACCAATCTGAA	60°C
STAT4 R	CTCGCAGGATGTCAGCGAA	60°C
JAK2 F	TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA	60°C
JAK2 R	AGACATGGTTGGGTGGATACC	60°C
STAT6 F	CAAAGCCCTAGTGCTGAAGAG	60°C
STAT6 R	CTCCTGCTGTAGCTGGGAATA	60°C
STAT3 F	GGAGGAGGCATTCGGAAAG	60°C
STAT3 R	TCGTTGGTGTACACACAGAT	60°C
FOXO4 F	CTTTCTGAAGACTGGCAGGAATGT	60°C
FOXO4 R	GATCTAGGTCTATGATCGCGGCAG	60°C

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento (T.a.).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados de expressão gênica obtidos na RT-qPCR foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as amostras adotaram distribuição normal e foram analisadas utilizando o teste Ordinary One-way ANOVA. A análise da expressão relativa diferencial foi realizada no software GraphPad Prism versão 10.3.1 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, EUA), calculando o $2\Delta\Delta Ct$ em comparação com a expressão dos oncogenes na linhagem celular C3 (célula de colo uterino HPV16 positiva). a partir da comparação dos valores de expressão dos genes de referência e dos fatores de transcrição avaliados com e sem transfecção dos oncogenes E5, E6 e E7 do HPV. Para determinar se as diferenças na expressão dos

transcritos foram significativas ou não, testes de hipótese ($p\text{-value} < 0,05$) foram aplicados.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação da transfecção

A transfecção dos três oncogenes nas células da linhagem MDA-MB-231, oriundas de carcinoma de mama humano foi confirmada com base na expressão de E5, E6 e E7. A análise confirmou a eficácia do processo de transfecção, garantindo a expressão dos oncogenes no modelo experimental. A Figura 10 ilustra as curvas de amplificação e de *melting*, demonstrando a expressão individual dos oncogenes E5, E6 e E7 nas células transfectadas.

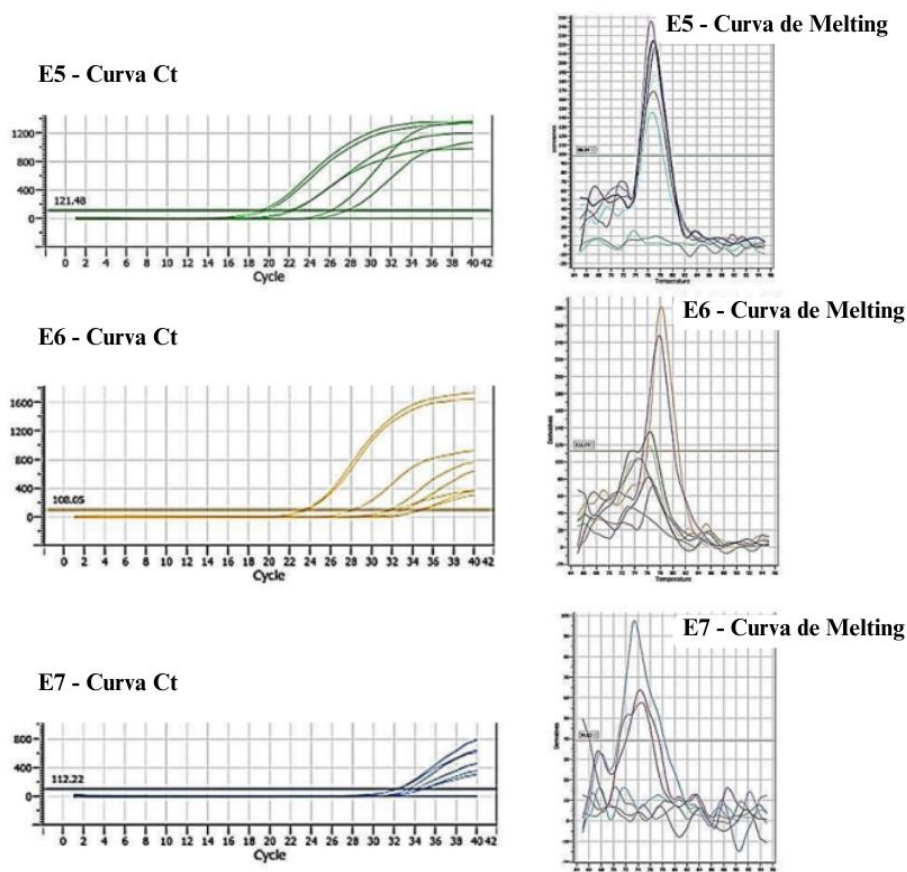


Figura 10: Curva Ct e *Melting* referente à expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 transfectados em células MDA-MB-231.

5.2 Análise da expressão gênica

A análise revelou que a expressão de STAT4 foi reduzida na presença dos oncogenes E5, E6 e E7, sugerindo uma possível interferência desses genes nas vias de sinalização reguladas por esse fator de transcrição. O gene FOXO4 apresentou uma leve tendência de aumento na presença de E7, enquanto E5 e E6 não promoveram alterações significativas. Já a expressão de STAT6 mostrou-se aumentada em células transfectadas com E5 e reduzida na presença de E6. O gene JAK2 exibiu uma tendência de aumento com E5, enquanto a expressão foi significativamente reduzida na presença de E6 e E7, sugerindo uma modulação negativa da sinalização JAK/STAT. De forma semelhante, a expressão de STAT3 foi fortemente reduzida em células transfectadas com E7, ao mesmo tempo em que apresentou uma tendência de aumento na presença de E5. Esses achados reforçam a hipótese de que o HPV influencia a regulação de vias críticas envolvidas no controle da sobrevivência celular e proliferação.

Na Figura 11 observam-se as alterações de expressão dos fatores de transcrição analisados, comparando as células-controle com as células transfectadas com os oncogenes. Os resultados são consistentes com a hipótese de que os oncogenes do HPV desempenham um papel ativo na modulação da expressão gênica em células de carcinoma de mama humano, potencialmente influenciando a progressão tumoral.

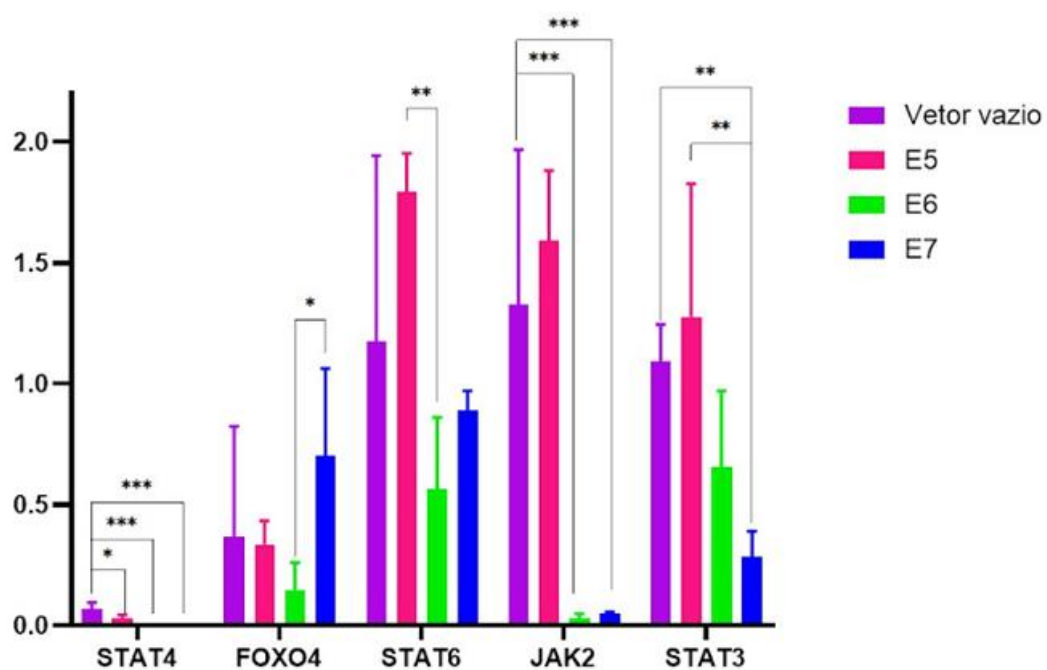


Figura 11: Expressão diferencial de fatores de transcrição (STAT3, FOXO4, JAK2, STAT4 e STAT6) em linhagens celulares MDA-MB-231 com e sem transfeccção com os oncogenes do HPV.

6 DISCUSSÃO

A transfecção genética é amplamente utilizada em estudos de processos celulares e mecanismos moleculares, caracterizando um método que visa introduzir ácidos nucleicos estranhos em células eucarióticas, alterando sua composição genética (Kim; Eberwine, 2010). A compreensão acerca das alterações em vias moleculares em diversas doenças, viabilizada pela técnica citada, pode levar à descoberta de biomarcadores específicos para diagnóstico e prognóstico (Gupta; Kumar, 2022). A técnica de RT-qPCR permite avaliar a eficiência da transfecção ao quantificar os níveis de expressão de ácidos nucleicos exógenos introduzidos na célula (Chong; Yeap; Ho, 2021). O presente estudo confirmou a eficácia da utilização da transfecção celular como método para avaliações em células que não apresentam os genes a serem explorados, além de, permitir a individualização dos componentes virais conforme a transfecção individual de E5, E6 e E7.

Diversos estudos têm sido realizados utilizando a metodologia da transfecção genética para avaliar a expressão de variados genes. Simpson *et al.* (2022) realizou a transfecção de células tumorais de mama, MDA-MB-231, com o cluster miR-200c/141, com o intuito de avaliar a expressão de miR-200c/141, associada à redução do crescimento e metástase do tumor mamário primário e do MXRA8, relatado como um potencial regulador do crescimento e metástase do tumor mamário (Simpson; Watson; Moorehead, 2022). A transfecção dos oncogenes E6 e E7 do HPV modulou a resposta imune em células MDA-MB-231 ao aumentar as células T reguladoras, reduzir linfócitos T CD8+ e CD56+, além de reduzir a expressão de monócitos, destacando a interação entre as oncoproteínas do HPV e células da linhagem mamária (Santos *et al.*, 2024). A transfecção das linhagens tumorais de pulmão A549 e NCI-H460, com os oncogenes E6 e E7 do HPV16, permitiu a análise da via de sinalização PI3K/Akt, que foi ativada pelas oncoproteínas, promovendo a transição epitelial-mesenquimal, por meio da regulação de fatores de transcrição, incluindo ZEB1, SNAI1, Slug e Twist1, levando a uma possível progressão tumoral (Liu *et al.*, 2018). Outro trabalho realizou a transfecção de linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas com os oncogenes do HPV16, observando uma associação da expressão de E5 e E7 com a ativação das vias JAK/STAT, com destaque à STAT4, JAK2 e STAT3, potencialmente influenciando na proliferação celular (São Marcos, 2023). Assim, observa-se que a transfecção genética representa

uma técnica relevante na condução de pesquisas acerca de mecanismos moleculares, oferecendo perspectivas promissoras para o diagnóstico, prognóstico e potencial desenvolvimento de terapias direcionadas.

. A cascata de sinalização STAT3 é hiperativada em cerca 70% dos cânceres, sendo associada a funções pró-tumorais (Strobel *et al.*, 2023). No presente estudo, foi observada inibição da expressão de STAT3 na presença do oncogene E7 do HPV, uma tendência de aumento da presença do E5 e E6 não resultou em alterações significativas. A atividade de STAT3 é antagonizada por p53, cuja degradação é promovida na presença da oncoproteína E6, permitindo assim a transformação maligna mediada pela STAT3 (Janjua *et al.*, 2024). A supressão da expressão de STAT3 foi associada a alterações na expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16, indicando uma forte correlação positiva entre a atividade constitutiva de STAT3 e a expressão dessas oncoproteínas (Thakur *et al.*, 2023). Embora a oncoproteína E6 seja considerada a principal responsável pela fosforilação e ativação de STAT3 em queratócitos infectados com HPV, todas as três oncoproteínas virais (E5, E6 e E7) têm a capacidade de induzir a fosforilação de STAT3 em células de câncer cervical associadas ao HPV (Morgan; Macdonald, 2020). A redução de STAT3 em células tumorais cervicais provoca um aumento significativo na expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, como p21, pRB e p53, e reduz a expressão de ciclina D1, favorecendo processos apoptóticos e ativação de caspases efetoras (Haręza; Wilczyński; Paradowska, 2022). A degradação de pRB, promovida pela E7, pode desregular diferentes vias de sinalização, incluindo JAK/STAT, impactando a transcrição de STAT3 e resultando na redução observada no estudo. Os resultados deste estudo indicam que a oncoproteína E7 do HPV pode inibir a expressão de STAT3, interrompendo o ciclo de retroalimentação pró-tumoral descrito em pesquisas anteriores. Como STAT3 é hiperativado em diversos cânceres e sua atividade está associada à regulação de oncoproteínas virais e ao controle do ciclo celular, sua supressão pode impactar processos fundamentais para a progressão tumoral.

A indução da expressão do fator de transcrição *STAT3* foi observada por Shukla *et al.* (2013) no qual células positivas para HPV16 mostram uma quantidade maior de *STAT3* ativo (pY705) em comparação com células negativas para HPV, sugerindo uma correlação positiva de *STAT3* com o HPV16 (Shukla *et al.*, 2013). A oncoproteína E5 do HPV está envolvida na ativação e aumento da via EGFR, que pode levar à fosforilação de STAT3, favorecendo a progressão do câncer de mama

(Medda; Duca; Chiocca, 2021; Ma; Qin; Li, 2020). É sugerido que a oncoproteína E5 tem a capacidade de induzir a fosforilação de STAT3, no entanto, até o momento, estudos que estabeleçam uma associação direta entre a oncoproteína E5 e a ativação ou regulação da sinalização STAT3 são escassos (Morgan; Macdonald, 2020). STAT3 é negativamente regulado por pRB, cuja degradação é promovida pela oncoproteína E7, resultando em desestabilização do ciclo regulatório do ciclo celular (Janjua *et al.*, 2024). Em linhagens celulares HPV16 positivas, foi observada uma correlação positiva entre E7 e STAT3, induzindo a proliferação celular e inibindo a apoptose (Shukla *et al.*, 2013). Contrariamente ao que foi previamente sugerido na literatura, o oncogene E7 do HPV16 pode levar à redução da atividade de STAT3, contribuindo para um prognóstico favorável.

A expressão de STAT4 também se apresentou diminuída em linhagens celulares transfectadas com os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV. STAT4 é ativado pela IL-12, estimulando células Th1 a produzir IFN- γ , permitindo uma maior eficácia na defesa contra vírus e bactérias intracelulares (Trinchieri, 2003). Desequilíbrios na expressão ou atividade de STAT4 têm sido associados a diversas doenças, incluindo câncer e doenças autoimunes, alterando o perfil Th1 (Tolomeo; Cascio, 2024). A expressão do STAT4 está associada a um mau prognóstico e metástase no câncer de ovário, indicando uma associação entre a expressão de STAT4, o processo de tumorigênese e metástase (Zhao *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2016). Entretanto, no câncer de cabeça e pescoço, foi sugerido que o STAT4 desempenha um papel fundamental na inibição da metástase tumoral, além de favorecer a eliminação do tumor (Anderson *et al.*, 2020). No câncer de mama, a maioria dos estudos implica o STAT4 em uma função supressora de tumor, correlacionada com melhor sobrevida geral e livre de recidiva (Wong *et al.*, 2022; Núñez-Marrero, 2019). Foi sugerido o oncogene E7 do HPV promove uma superexpressão de STAT4 em camundongos transgênicos K14E7, transdução de sinal, transporte, processo metabólico, processo de oxidação-redução, desregulando processos de diferenciação celular e resposta imunológica (Sierra *et al.*, 2012). No carcinoma cervical, altos níveis de transcritos de STAT4 estão correlacionados com melhor sobrevida em pacientes HPV-negativos (Thakur *et al.*, 2022). Portanto, a diminuição da expressão de STAT4 observada nas linhagens celulares transfectadas com oncogenes do HPV sugere uma possível interferência no mecanismo imunológico de defesa mediado pela IL-12 e na resposta Th1, o que pode contribuir para a evasão do sistema imunológico durante a tumorigênese. Embora a

literatura mostre uma associação entre STAT4 e pior prognóstico em diversos tipos de câncer, como o de ovário, e uma relação com a supressão tumoral e melhor prognóstico em outros, como no câncer de mama, a função específica de STAT4 no contexto do câncer de mama relacionado ao HPV ainda necessita de mais investigações. Esse entendimento pode abrir portas para a modulação dessa via como uma estratégia terapêutica no controle do câncer HPV-associado, considerando a complexidade das respostas imunes no microambiente tumoral.

A transfecção com o oncogene E5 resultou em uma tendência de aumento na expressão de JAK2; em contrapartida, na presença dos oncogenes E6 e E7, a expressão de JAK2 foi significativamente diminuída. A superexpressão do JAK2 está associada a tumores sólidos, como carcinoma gástrico e hepatocelular, com a tumorigênese ligada à sua atividade aumentada, enquanto o silenciamento de JAK2 protege contra o desenvolvimento de diversos cânceres (Qian; Yao; Si, 2011). No câncer de mama, a via JAK2/STAT5 desempenha um papel dual, sendo essencial para o crescimento e diferenciação celular e atuando como proto-oncogene na iniciação tumoral e, paradoxalmente, restringindo o potencial metastático das células neoplásicas (Wagner; Rui, 2008). Foi demonstrado que a oncoproteína E6 do HPV18 induziu a fosforilação de JAK2, apontando um papel essencial para o ciclo de replicação do HPV e um alvo possível para intervenção terapêutica (Morgan *et al.*, 2018). Em células de câncer cervical HPV positivas, a inibição de JAK2 reduziu a proliferação celular (Morgan; Macdonald, 2020). Nossos resultados destacam que, embora a transfecção com o oncogene E5 tenha aumentado discretamente a expressão de JAK2, os oncogenes E6 e E7 tiveram expressão reduzida, sugerindo que diferentes oncoproteínas podem modular essa via de sinalização de maneiras diversas, possivelmente refletindo papéis específicos em diferentes estágios da tumorigênese. A desregulação da expressão de JAK2 mediada pelas oncoproteínas do HPV16 destaca sua relevância na proliferação celular, reforçando a importância dessa via como alvo terapêutico, sugerindo que o bloqueio de JAK2 possa ser uma estratégia promissora em determinados contextos tumorais.

Nos resultados obtidos no estudo, o gene FOXO4 apresentou uma leve tendência de aumento na presença de E7, enquanto E5 e E6 não promoveram alterações significativas. A desregulação desse fator tem sido ligada à progressão de diferentes tipos de câncer, senescência e outras doenças (Liu *et al.*, 2020). No câncer cervical, foi observado que a carga de HPV se correlaciona positivamente com a

expressão de FOXO4 (Qin *et al.*, 2019). Um estudo realizou a transfecção do HPV em células A549, linhagem de câncer de pulmão, observando uma superexpressão de FOXO4, sugerindo um mecanismo compensatório, no qual há um aumento da transcrição do gene para compensar possíveis bloqueios na atividade da proteína, mediado pelas oncoproteínas do vírus (São Marcos, 2023). Em células MDA-MB-231 transfectadas com as oncoproteínas do HPV, foi relatada uma maior expressão de FOXO4, sugerindo um possível papel pró-tumoral do vírus no câncer de mama, uma vez que a desregulação do fator de transcrição pode influenciar processos como estresse oxidativo e apoptose (Santos, 2023). Dessa forma, nossos dados sugerem que a oncoproteína E7 do HPV pode influenciar a expressão de FOXO4 em células tumorais de mama, possivelmente por um mecanismo compensatório que busca manter sua atividade funcional. Considerando o papel dual de FOXO4 na regulação do ciclo celular e apoptose, sua superexpressão em amostras HPV-positivas pode indicar um efeito pró-tumoral no câncer de mama. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos específicos pelos quais o HPV modula a expressão e função de FOXO4.

A expressão de STAT6 mostrou-se aumentada em células transfectadas com E5 e reduzida na presença de E6. No câncer de mama, STAT6 desempenha um papel fundamental na inibição do crescimento e na indução de apoptose, sendo ativado por IL-4 de forma independente de IRS-1 (Gooch; Christy; Yee, 2002). Foi proposto que STAT6, ao atuar como transdutor e ativador de vias de sinalização mediadas por IFN- γ e TNF- α , contribui para a regulação da viabilidade celular em câncer cervical e melhor sobrevida, uma vez que seu silenciamento induz apoptose e expressão de p53 (Li; Guan; Liu, 2014). Além disso, estudos relatam que as oncoproteínas E5, E6 e E7 e E5 do HPV modulam a ativação de STAT6, divergindo dos resultados obtidos no presente trabalho (Gutiérrez-Hoya; Soto-Cruz, 2020). Pesquisas sobre a interação entre STAT6, células Th2 e o HPV ainda são escassas. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a expressão de STAT6 é modulada de maneira distinta pelas oncoproteínas E5 e E6 do HPV, com um aumento na presença de E5 e uma diminuição quando E6 está presente. A literatura aponta que STAT6 desempenha papéis importantes na regulação da viabilidade celular e na indução de apoptose em diversos tipos de câncer. No entanto, as discrepâncias entre os nossos resultados e os estudos anteriores indicam que a interação entre as oncoproteínas do HPV e a

sinalização de STAT6 pode ser mais complexa e variável dependendo do tipo celular ou contexto tumoral.

Nos últimos anos, a relação entre infecção pelo HPV e os cânceres cervical, anogenital e de cabeça e pescoço foi bem estabelecida. No que tange ao câncer de mama, apesar da identificação de material viral e da expressão de oncoproteínas em amostras de tumores mamários, ainda não foi possível estabelecer uma relação causal entre o HPV e o câncer de mama. No presente estudo, observa-se que o vírus pode alterar a expressão dos fatores de transcrição associados ao microambiente tumoral do câncer de mama, demonstrando um possível envolvimento no desenvolvimento dessa neoplasia.

7 CONCLUSÃO

A transfecção com os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV revelou a modulação de vias envolvidas com os fatores STAT3, STAT4, JAK2, FOXO4 e STAT6. A expressão de STAT3 foi inibida pela oncoproteína E7, enquanto E6 e E7 reduziram a expressão de JAK2, evidenciando que diferentes oncoproteínas podem agir de maneiras específicas durante a tumorigênese. Além disso, a presença do HPV parece influenciar negativamente a expressão do STAT4, o que pode interferir na resposta imunológica e contribuir para a evasão do sistema imunológico. Por outro lado, a modulação de FOXO4 e STAT6 foi observada de maneira dependente das oncoproteínas, com E7 influenciando a expressão de FOXO4 em um mecanismo compensatório possível, enquanto E5 aumentou a expressão de STAT6. Embora os resultados apresentem algumas divergências em relação aos estudos anteriores, o estudo fortalece a hipótese de que o HPV pode afetar a expressão de fatores de transcrição relevantes para o microambiente tumoral do câncer de mama. Por fim, esse estudo indica que o vírus pode desempenhar um papel modulador na expressão gênica, potencialmente influenciando o comportamento tumoral.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, M.; USTOYEV, Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 35, n. 5, p. 150923, 1 out. 2019.
- AGRAWAL, M. et al. Experimental therapeutics for patients with myeloproliferative neoplasias. **Cancer**, v. 117, n. 4, p. 662–676, 4 out. 2010.
- ALLINEN, M. et al. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. **Cancer Cell**, v. 6, n. 1, p. 17–32, jul. 2004.
- ALTORKI, N. K. et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 1, p. 9–31, 10 dez. 2018.
- AMADOR-MOLINA, A. et al. Innate immunity against human papillomavirus (HPV) and effect of adjuvants in promoting specific immune response. **Viruses**, v. 5, n. 11, p. 2624–2642, 2013.
- ANDERSON, K. et al. Immune Suppression Mediated by STAT4 Deficiency Promotes Lymphatic Metastasis in HNSCC. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 15 jan. 2020.
- ARIMA, N. et al. Ki-67 index value and progesterone receptor status can predict prognosis and suitable treatment in node-negative breast cancer patients with estrogen receptor-positive and HER2-negative tumors. **Oncology Letters**, 29 out. 2018.
- ARNETH, B. Tumor Microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 1, p. 15, 30 dez. 2019.
- ARUN, B. et al. BRCA-mutated breast cancer: the unmet need, challenges and therapeutic benefits of genetic testing. **British Journal of Cancer**, 30 ago. 2024.
- 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.

Atenhan, A. Identification and characterization of new factors regulating the phenotype of Th17 and Th22 cells. **Universidade Técnica de Munique**. 2018

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, out. 2010.

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.

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.

BEJARANO, Leire; JORDÃO, Marta JC; JOYCE, Johanna A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. **Cancer discovery**, v. 11, n. 4, p. 933- 959, 2021.

BENEVIDES, L. et al. Enrichment of regulatory T cells in invasive breast tumor correlates with the upregulation of IL-17A expression and invasiveness of the tumor. **European Journal of Immunology**, v. 43, n. 6, p. 1518–1528, 16 maio 2013.

BERNARD, H.-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 1–6, mar. 2005.

BERNARDES, N. B. et al. Câncer de Mama X Diagnóstico / Breast Cancer X Diagnosis. ID online **REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 13, n. 44, p. 877–885, 27 fev. 2019.

BHATTACHARJEE et al., Mechanistic role of HPV-associated early proteins in cervical cancer: Molecular pathways and targeted therapeutic strategies. **Critical Reviews in Oncology / Hematology** 174 (2022) 103675, 2022.

BOLPETTI, A. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in human papillomavirus 16 tumor growth. **BMC Immunology**, v. 11, n. 27, 2010.

BONFIGLIO, R.; DI PIETRO, M. L. The impact of oral contraceptive use on breast cancer risk: State of the art and future perspectives in the era of 4P medicine. **Seminars in Cancer Biology**, v. 72, p. 11–18, jul. 2021.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Infecção pelo Hpv: Taxa de HPV na genital atinge 54,4% das mulheres e 41,6% dos homens no Brasil. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/dezembro/taxa-de-hpv-na-genital-atinge-54-4-das-mulheres-e-41-6-dos-homens-no-brasil-diz-estudo>

BROMBERG, J. F. et al. Stat3 as an Oncogene. **Cell**, v. 98, n. 3, p. 295–303, ago. 1999.

BROOKS, A. J.; PUTOCZKI, T. JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1971, 20 jul. 2020.

BURD, E. M.; DEAN, C. L. Human Papillomavirus. **American Society for Microbiology Press**, v. 4, n. 4, p. 1–17, 2016.

BURK, R. D. et al. (2013) Human papillomavirus genome variants. **Virology**, 445, 232–243.

BUSTIN, S. A.; WITTEWER, C. T. MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. **Clinical Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1537–1538, 1 set. 2017.

BUTCHER, M. J.; ZHU, J. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. **Faculty Reviews**, v. 10, p. 30, 15 mar. 2021.

CHAROSTAD, J. et al. Upregulation of Interleukin-6 in HPV-Positive Breast Cancer Patients. **Iran J Immunol**, v. 18, n. 4, p. 315–330, 2021.

CHEANG, M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736–750, 20 maio 2009.

CHONG, Z. X.; YEAP, S. K.; HO, W. Y. Transfection types, methods and strategies: a technical review. **PeerJ**, v. 9, 21 abr. 2021.

CLERICI, M. et al. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: association with human papillomavirus infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 3, p. 245–250, 1997.

Coelho, Aline, et al. Câncer de mama: a visão do oncologista para o mastologista. 3o ed, **Editora DOC**, 2024.

COHEN, S. Y. et al. Modifiable risk factors in women at high risk of breast cancer: a systematic review. **Breast Cancer Research**, v. 25, n. 1, 24 abr. 2023.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-447, 2010.

CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 1 fev. 2003.

CUNHA, A. DA. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 495, 2014.

DA MOTA NUNES, Z. et al. Detection of Human Papillomavirus (HPV) and Bovine Leukemia Virus (BLV) in breast cancer patients from Northeastern Brazil. **Pré-impressões**. 2024

DARNELL, J.; KERR, I.; STARK, G. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 3 jun. 1994.

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.

DELLA FERA, A. N. et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 321, 20 fev. 2021.

DERAKHSHAN, F.; REIS-FILHO, J. S. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 17, n. 1, p. 181–204, 24 jan. 2022.

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

DIECI, M. V. et al. Rare Breast Cancer Subtypes: Histological, Molecular, and Clinical Peculiarities. **The Oncologist**, v. 19, n. 8, p. 805–813, 26 jun. 2014.

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

DISANTO, J. P. Cytokines: Shared receptors, distinct functions. **Current Biology**, v. 7, n. 7, p. R424–R426, jul. 1997.

DISIS, M. L.; PARK, K. H. Immunomodulation of Breast Cancer via Tumor Antigen Specific Th1. **Cancer Research and Treatment**, v. 41, n. 3, p. 117, 2009.

DOORBAR J et al. The papillomavirus life cycle. **J. Clin. Virol.**, 32, 7–15, 2005

DURBIN, J. E. et al. Targeted Disruption of the Mouse Stat1 Gene Results in Compromised Innate Immunity to Viral Disease. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 443–450, fev. 1996.

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

ERBER, R.; HARTMANN, A. Histology of Luminal Breast Cancer. **Breast Care**, v. 15, n. 4, p. 327–336, 2020.

FARRAR, J. D. et al. Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. **Nature Immunology**, v. 1, n. 1, p. 65–69, 1 jul. 2000.

FAVRE, M.; RAMOZ, N.; ORTH, G. Human papillomaviruses: General features. **Clinics in Dermatology**, v. 15, n. 2, p. 181–198, mar. 1997.

FEDRIZZI, E. N.; LEVI, J. E. Genital Human Papillomavirus Infection in women from Florianópolis - Santa Catarina, Brazil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 35, 2023.

FERLAY, J. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Lyon, France: **International Agency for Research on Cancer**. 2024. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>

FERNANDES, J. V.; et al. T. Biology and natural history of human papillomavirus infection. **Open Access Journal of Clinical Trials**, p. 1, jan. 2013.

FUKE, H. et al. Jak inhibitor induces S phase cell-cycle arrest and augments TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 3, p. 738–744, 1 nov. 2007.

FURTH, P. A. STAT signaling in different breast cancer sub-types. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 612–615, jan. 2014.

GAO, D.; FISH, E. N. Chemokines in breast cancer: Regulating metabolism. **Cytokine**, v. 109, p. 57–64, 1 set. 2018.

GARAUD, S. et al. Tumor-infiltrating B cells signal functional humoral immune responses in breast cancer. **JCI insight**, v. 4, n. 18, 19 set. 2019.

GEBREGZABHER, E. et al. Detection of High- and Low-Risk HPV DNA in Archived Breast Carcinoma Tissues from Ethiopian Women. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2021, p. 1–6, 11 out. 2021.

GECZIK, A. M. et al. Adherence to the 2020 American Cancer Society Guideline for Cancer Prevention and risk of breast cancer for women at increased familial and genetic risk in the Breast Cancer Family Registry: an evaluation of the weight, physical activity, and alcohol consumption recommendations. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2 jul. 2022.

GOOCH, J. L.; CHRISTY, B.; YEE, D. STAT6 Mediates Interleukin-4 Growth Inhibition in Human Breast Cancer Cells. **Neoplasia**, v. 4, n. 4, p. 324–331, 2002.

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, S. 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.

GUPTA, A. K.; KUMAR, M. An integrative approach toward identification and analysis of therapeutic targets involved in HPV pathogenesis with a focus on carcinomas. **Cancer Biomarkers**, p. 1–22, 30 set. 2022.

GUTIÉRREZ-HOYA, A.; SOTO-CRUZ, I. Role of the JAK/STAT Pathway in Cervical Cancer: Its Relationship with HPV E6/E7 Oncoproteins. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 2297, 15 out. 2020.

HAMMES, L. S. et al. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN): Clinical-pathological correlation. **Gynecologic Oncology**, v. 105, n. 1, p. 157–165, 2007.

HAREŹA, D. A.; WILCZYŃSKI, J. R.; PARADOWSKA, E. Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1818, 5 fev. 2022.

HASAN, U. A. et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 3186–3197, 2007.

HATANO, Takashi et al. Identification of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and the ensuing patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **International journal of cancer**, v. 140, n. 7, p. 1571-1580, 2017.

HE, J.; ZHANG, Y. Janus Kinase 2: An Epigenetic “Writer” that Activates Leukemogenic Genes. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 5, p. 231–233, 5 jan. 2010.

HEDVAT, M. et al. The JAK2 Inhibitor AZD1480 Potently Blocks Stat3 Signaling and Oncogenesis in Solid Tumors. **Cancer Cell**, v. 16, n. 6, p. 487–497, dez. 2009.

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

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. **Cancer Research**, v. 79, n. 18, p. 4557–4566, 26 jul. 2019.

HÖLLER, A. et al. “Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Luminal Breast Cancer: Where are We Now?” **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 15, p. 525–540, 28 jul. 2023.

HONG, R.; XU, B. Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. **Cancer Communications**, v. 42, n. 10, p. 913–936, 8 set. 2022.

HOZHABRI, H. et al. A comprehensive bioinformatics analysis to identify potential prognostic biomarkers among CC and CXC chemokines in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 20 jun. 2022.

HU, X. et al. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 26 nov. 2021.

HUBER-KEENER, K. J. Cancer genetics and breast cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 82, jan. 2022.

HUGHES, C. E.; NIBBS, R. J. B. A guide to chemokines and their receptors. **The Febs Journal**, v. 285, n. 16, p. 2944–2971, 1 ago. 2018.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Controle do câncer de mama no Brasil : dados e números : 2024 / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2024. 69 p. : il. color. ISBN 978-65-88517-69-7 (versão eletrônica) 1. Neoplasias da mama. 2. Neoplasias - prevenção & controle. 3. Indicadores (Estatística). I. Título.

JAIN, M. et al. Epidemiology, Molecular Pathogenesis, Immuno-Pathogenesis, Immune Escape Mechanisms and Vaccine Evaluation for HPV-Associated Carcinogenesis. **Pathogens**, v. 12, n. 12, p. 1380–1380, 23 nov. 2023.

JANJUA, D. et al. Prognostic and therapeutic potential of STAT3: Opportunities and challenges in targeting HPV-mediated cervical carcinogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 197, p. 104346, maio 2024.

JIANG, S. et al. Novel role of forkhead box O 4 transcription factor in cancer: Bringing out the good or the bad. **Seminars in Cancer Biology**, v. 50, p. 1–12, jun. 2018.

JING, X. et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, 11 nov. 2019.

JOHNSON, K. S.; CONANT, E. F.; SOO, M. S. Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. **Journal of Breast Imaging**, v. 3, n. 1, 30 dez. 2020.

KAMIŃSKA, M. et al. Breast cancer risk factors. **Menopausal Review**, v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015.

KAMOLRATANAKUL, S.; PITISUTTITHUM, P. Human Papillomavirus Vaccine Efficacy and Effectiveness against Cancer. **Vaccines**, v. 9, n. 12, p. 1413, 30 nov. 2021.

KAPLAN, M. H.; WURSTER, A. L.; GRUSBY, M. J. A Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)4-independent Pathway for the Development of T Helper Type 1 Cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 6, p. 1191–1196, 21 set. 1998.

KARACHALIOS, C. et al. Human papillomaviruses and breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **Oncology Letters**, v. 27, n. 2, 22 dez. 2023.

KARPISHEH, V. et al. The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 22, n. 1, 5 mar. 2022.

KAWAGUCHI, K. et al. Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 27 fev. 2019.

KHAMMAPIRAD, T. et al. Intraductal papilloma of the breast in association with preoncogenic gene of breast cancer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 161–163, 1 abr. 2011.

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.

KIM, T. K.; EBERWINE, J. H. Mammalian Cell transfection: the Present and the Future. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3173–3178, 13 jun. 2010.

KNUTSON, K. L.; DISIS, M. L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 8, p. 721–728, 27 jan. 2005.

KOBAYASHI, A. et al. Evolution of the immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 5, p. 412–420, 2008.

KOROMILAS, A. E.; SEXL, V. The tumor suppressor function of STAT1 in breast cancer. **JAK-STAT**, v. 2, n. 2, p. e23353, abr. 2013.

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

KUFAREVA, I.; SALANGA, C. L.; HANDEL, T. M. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. **Immunology & Cell Biology**, v. 93, n. 4, p. 372–383, 24 fev. 2015.

KUPFERMAN, M. E. et al. Therapeutic suppression of constitutive and inducible JAK\STAT activation in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 8, p. 117–127, 2009.

LAUMONT, C. M.; NELSON, B. H. B cells in the tumor microenvironment: Multi-faceted organizers, regulators, and effectors of anti-tumor immunity. **Cancer Cell**, v. 41, n. 3, p. 466–489, 1 mar. 2023.

LAWSON, J. S.; SALMONS, B.; GLENN, W. K. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein–Barr Virus (EBV). **Frontiers in Oncology**, v. 8, 22 jan. 2018.

LEBRE, M. C. et al. Human keratinocytes express functional Toll-Like Receptors 3, 4, 5, and 9. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 2, p. 331–341, 2007.

LECHIEN, J. R. et al. HPV Involvement in the Tumor Microenvironment and Immune Treatment in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1060, 25 abr. 2020.

LEE, J. et al. Sedentary work and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Occupational Health**, v. 63, n. 1, jan. 2021.

LEE, J. W. et al. Absence of JAK2 V617F mutation in gastric cancers. **Acta Oncologica**, v. 45, n. 2, p. 222–223, 29 nov. 2005.

LEE, K. et al. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment. **Current Oncology Reports**, v. 21, n. 5, 27 mar. 2019.

LEMOES, L. et al. Racial disparities in breast cancer survival after treatment initiation in Brazil: a nationwide cohort study. **The Lancet Global Health**, v. 12, n. 2, p. e292–e305, 1 fev. 2024.

LEPIQUE, A. P. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 13, p. 4391–4400, 2009.

LI, Y. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, 29 ago. 2022.

LI, Z.; GUAN, Y.-Q.; LIU, J.-M. The role of STAT-6 as a key transcription regulator in HeLa cell death induced by IFN- γ /TNF- α co-immobilized on nanoparticles. **Biomaterials**, v. 35, n. 18, p. 5016–5027, 25 mar. 2014.

LIU, J. et al. PI3K/Akt/HIF-1 α signaling pathway mediates HPV-16 oncoprotein-induced expression of EMT-related transcription factors in non-small cell lung cancer cells. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 19, p. 3456–3466, 2018.

LIU, L. et al. Correlation between family history and characteristics of breast cancer. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 18 mar. 2021.

LIU, W.; LI, Y.; LUO, B. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 4, p. 651–663, 16 set. 2019.

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, 2021.

LUO, J. et. al. STAT4 expression is correlated with clinicopathological characteristics of cervical lesions. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.** 9:3751–3758.9. 3751-3758, 2016.

MA, J.; QIN, L.; LI, X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. **Cell Communication and Signaling**, v. 18, n. 1, 28 fev. 2020.

MA, Y. et al. Dendritic Cells in the Cancer Microenvironment. **Journal of Cancer**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 36–44, 2013.

MAHMOUD, S. M. A. et al. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 132, n. 2, p. 545–553, 1 abr. 2012.

MANZO-MERINO, J. et al. Immunology of cervical cancer. **Revista Clínica Española**, v. 72, n. 4, p. 188–197, 2020.

MAO, X. et al. Association of reproductive risk factors and breast cancer molecular subtypes: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 23, n. 1, 10 jul. 2023.

MCCART REED, A. E. et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: the increasing importance of this special subtype. **Breast Cancer Research**, v. 23, n. 1, 7 jan. 2021.

MEDDA, A.; DUCA, D.; CHIOCCA, S. Human Papillomavirus and Cellular Pathways: Hits and Targets. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 262, 1 mar. 2021.

MEHTA, A. K. et al. Macrophage Biology and Mechanisms of Immune Suppression in Breast Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 23 abr. 2021.

MÉNDEZ-GARCÍA, L. A. et al. Breast Cancer Metastasis: Are Cytokines Important Players During Its Development and Progression? **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 39, n. 1, p. 39–55, jan. 2019.

MERAZ, M. A. et al. Targeted Disruption of the Stat1 Gene in Mice Reveals Unexpected Physiologic Specificity in the JAK–STAT Signaling Pathway. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 431–442, fev. 1996.

MORGAN, E. L. et al. STAT3 activation by E6 is essential for the differentiation-dependent HPV18 life cycle. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006975, 9 abr. 2018.

MORGAN, E. L.; MACDONALD, A. Manipulation of JAK/STAT Signalling by High-Risk HPVs: Potential Therapeutic Targets for HPV-Associated Malignancies. **Viruses**, v. 12, n. 9, 3 set. 2020.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 3, p. S1–S10, ago. 2006.

NAGARSHETH, N.; WICHA, M. S.; ZOU, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 559–572, 30 maio 2017.

NASCIMENTO, K. C. G. et al. HPV Detection in Breast Tumors and Associated Risk Factors in Northeastern Brazil. **Cells**, v. 13, n. 13, p. 1132, 1 jan. 2024.

NASCIMENTO, R. G. DO; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, 2020.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern recognition via the Toll-Like Receptor system in the human female genital tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 976024, 2010.

NELSON, C. W.; MIRABELLO, L. Human papillomavirus genomics: Understanding carcinogenicity. **Tumour Virus Research**, v. 15, p. 200258, fev. 2023.

NELSON, M. A. et al. Prognostic and therapeutic role of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 40, n. 2, p. 519–536, 7 maio 2021.

NENGROO, M. A.; VERMA, A.; DATTA, D. Cytokine chemokine network in tumor microenvironment: Impact on CSC properties and therapeutic applications. **Cytokine**, v. 156, p. 155916–155916, 1 ago. 2022.

NÚÑEZ-MARRERO, A. Assessing the Role of the Interleukin-12/STAT4 Axis in Breast Cancer by a Bioinformatics Approach. **PubMed**, v. 48, n. 2, p. 38–52, 1 jan. 2019.

O'CONNOR, M. et al. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. 1995.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine**, v. 103, n. 3, p. e36905–e36905, 19 jan. 2024.

OGENYI, S. I. et al. PIK3CA, KI67, Estrogen (ER) and Progesterone Receptors (PR) Expression Pattern of in HER2 Positive Breast Cancers. **Asian Pacific Journal of Cancer Biology**, v. 6, n. 4, p. 281–287, 3 fev. 2022.

ORRANTIA-BORUNDA, E. et al. Subtypes of Breast Cancer. **Breast Cancer**, p. 31–42, 4 ago. 2022.

OSHI, M. et al. M1 Macrophage and M1/M2 ratio defined by transcriptomic signatures resemble only part of their conventional clinical characteristics in breast cancer. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 6 out. 2020.

OYOUNI, A. A. A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. **Journal of Infection and Public Health**, v. 16, n. 4, p. 626–631, abr. 2023.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, set. 2015.

PARK, C. et al. Immune Response in Stat2 Knockout Mice. **Immunity**, v. 13, n. 6, p. 795–804, dez. 2000.

PATEL, R. Predicting invasive ductal carcinoma using a Reinforcement Sample Learning Strategy using Deep Learning. **arXiv (Cornell University)**, 1 jan. 2021.

PEGHINI, B. C. et al. Local cytokine profiles in patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human Immunology**, v. 73, n. 9, p. 920–926, 2012.

PENG, Z. et al. Elevated profiles of peripheral Th22, Th17, Th2 cells, and decreased percentage of Th1 cells in breast cancer patients. **Thoracic Cancer**, v. 14, n. 33, p. 3282–3294, 21 set. 2023.

PLANK, M. W. et al. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 5, p. 2182–2190, 19 jan. 2017.

PRADHAN, R.; KUNDU, A.; KUNDU, C. N. The cytokines in tumor microenvironment: from cancer initiation-elongation-progression to metastatic outgrowth. **Critical reviews in oncology/hematology**, p. 104311–104311, 1 mar. 2024.

PURRAHMAN, D. et al. Association of human papillomavirus with breast cancer: a new perspective on an old debate. **Future Oncology**, v. 18, n. 22, p. 2483–2494, 1 jul. 2022.

QIAN, C.; YAO, J.; SI, J. Nuclear JAK2: Form and Function in Cancer. **The Anatomical Record**, v. 294, n. 9, p. 1446–1459, 1 ago. 2011.

QIN, Y. et al. Cervical Cancer Neoantigen Landscape and Immune Activity is Associated with Human Papillomavirus Master Regulators. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 16 jun. 2017.

RUSCITTO, F. et al. Beyond Genetics: Metastasis as an Adaptive Response in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6271, 3 jun. 2022.

SAAB, S. et al. Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 11 fev. 2020.

SAILLARD, M. et al. Impact of Immunotherapy on CD4 T Cell Phenotypes and Function in Cancer. **Vaccines**, v. 9, n. 5, p. 454–454, 4 maio 2021.

SAKAMOTO, K. et al. The Janus Kinase 2 Is Required for Expression and Nuclear Accumulation of Cyclin D1 in Proliferating Mammary Epithelial Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 8, p. 1877–1892, 1 ago. 2007.

SANTOS, D. L. et al. Immunological Response against Breast Lineage Cells Transfected with Human Papillomavirus (HPV). **Viruses**, v. 16, n. 5, p. 717–717, 30 abr. 2024.

SANTOS, Daffany Luana dos. Análise do papel do Papilomavírus humano no contexto do microambiente tumoral do câncer de mama. 2023. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) – **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2023.

SÃO MARCOS, Bianca de França. Avaliação do microambiente tumoral pulmonar infectado com o papilomavírus humano. 2023. Tese (Doutorado em Genética) – **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2023

SARHANGI, N. et al. Breast cancer in the era of precision medicine. **Molecular Biology Reports**, v. 49, n. 10, p. 10023–10037, 22 jun. 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.

SCHINDLER, C.; DARNELL, J. E. Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 621–652, jun. 1995.

SCOTT-WITTENBORN, N.; FAKHRY, C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 31, n. 4, p. 286–296, out. 2021.

SEIF, F. et al. The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. **Cell Communication and Signaling**, v. 15, n. 1, 21 jun. 2017.

SEMESIUK, N., et al. Disseminated tumor cells and enhanced level of some cytokines in bone marrow and peripheral blood of breast cancer patients as predictive factors of tumor progression. **Experimental oncology**. V. 35, p. 295-302, 2013.

SHEPPARD, P. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**, v. 4, n. 1, p. 63–68, 2 dez. 2002.

SHIMODA, K. et al. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted State6 gene. **Nature**, v. 380, n. 6575, p. 630–633, 1 abr. 1996.

SHIYANBOLA, O. O. et al. Emerging Trends in Family History of Breast Cancer and Associated Risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 12, p. 1753–1760, 6 out. 2017.

SHUKLA, S. et al. Functional Regulatory Role of STAT3 in HPV16-Mediated Cervical Carcinogenesis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e67849, 18 jul. 2013.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210–219, mar. 2002.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 12 jan. 2023.

SIERRA, E. I. et al. Differential gene expression between skin and cervix induced by the E7 oncoprotein in a transgenic mouse model. **Virology**, v. 433, n. 2, p. 337–345, nov. 2012.

SIMPSON, K. E.; WATSON, K. L.; MOOREHEAD, R. A. Elevated Expression of miR-200c/141 in MDA-MB-231 Cells Suppresses MXRA8 Levels and Impairs Breast Cancer Growth and Metastasis In Vivo. **Genes**, v. 13, n. 4, p. 691–691, 14 abr. 2022.

SOKOLOVA, A.; LAKHANI, S. R. Lobular carcinoma in situ: diagnostic criteria and molecular correlates. **Modern Pathology**, v. 34, n. S1, p. 8–14, 6 out. 2020.

SOUSA, S. et al. Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, 5 ago. 2015.

STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1456–1460, 23 nov. 2007.

STAREK-ŚWIECHOWICZ, B.; BUDZISZEWSKA, B.; STAREK, A. Alcohol and breast cancer. **Pharmacological Reports**, v. 75, 30 out. 2022.

STROBEL, T. D. et al. Revisiting the role of endogenous STAT3 in HPV-positive cervical cancer cells. **Journal of medical virology**, v. 95, n. 11, 1 nov. 2023.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 1999. p. 379-386.

SUN, L. et al. T cells in health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, 19 jun. 2023.

SUN, Y. et al. FOXO4 Inhibits the Migration and Metastasis of Colorectal Cancer by Regulating the APC2/ β -Catenin Axis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 23 set. 2021.

TAKEDA, K. et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 3801–3804, 15 abr. 1997.

TAKEDA, K. et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. **Nature**, v. 380, n. 6575, p. 627–630, abr. 1996.

TEGLUND, S. et al. Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 841–850, maio 1998.

THAKUR, K. et al. Investigation of molecular mechanisms underlying JAK/STAT signaling pathway in HPV-induced cervical carcinogenesis using “omics” approach. **Medical Oncology**, v. 39, n. 12, 12 out. 2022.

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.

TOKUMARU, Y. et al. Association of Th2 high tumors with aggressive features of breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 15_suppl, p. e12584–e12584, 20 maio 2020.

TOLOMEO, M.; CASCIO, A. STAT4 and STAT6, their role in cellular and humoral immunity and in diverse human diseases. **International reviews of immunology**, v. 43, n. 6, p. 394–418, 2024.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–146, 1 fev. 2003.

TURNER, M. D. et al. Cytokines and chemokines: at the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, nov. 2014.

USMAN, M. et al. Breast Cancer Risk and Human Papillomavirus Infection: A Bradford Hill Criteria Based Evaluation. **Infectious Disorders - Drug Targets**, v. 22, 20 jan. 2022.

VILSMAIER, T. et al. Angiogenic cytokines and their influence on circulating tumour cells in sera of patients with the primary diagnosis of breast cancer before treatment. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, 27 jul. 2016.

WAGNER, K.-U.; RUI, H. Jak2/Stat5 Signaling in Mammogenesis, Breast Cancer Initiation and Progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 13, n. 1, p. 93–103, 29 jan. 2008.

WANG, T. et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, n. 1, p. 48–55, 13 fev. 2011.

WANG, Y. et al. Improved breast cancer histological grading using deep learning. **Annals of Oncology**, set. 2021.

WANG, Y.; ZHOU, Y.; GRAVES, D. T. FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

WHO - World Health Organization. Breast Cancer. **World Health Organization**; 2024. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

WILKINSON, L.; GATHANI, T. Understanding breast cancer as a global health concern. **The British Journal of Radiology**, v. 95, n. 1130, 14 dez. 2021

WILSON, G. M. et al. Ductal Carcinoma in Situ: Molecular Changes Accompanying Disease Progression. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 27, n. 1, p. 101–131, mar. 2022.

WONG, G. L. et al. STAT family of transcription factors in breast cancer: Pathogenesis and therapeutic opportunities and challenges. **Seminars in Cancer Biology**, v. 86, p. 84–106, 1 nov. 2022.

WU, L. et al. Breast Cancer Cell–Neutrophil Interactions Enhance Neutrophil Survival and Pro-Tumorigenic Activities. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2884, 8 out. 2020.

WU, L.; SAXENA, S.; SINGH, R. K. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 1–20, 2020.

XUE, C. et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, 19 maio 2023.

YAMAOKA, K. et al. The Janus kinases (Jaks). **Genome Biology**, v. 5, p. 253, 2004.

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

YOUSEFI, Z. et al. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 805695, 27 jan. 2022.

YU, L.; MAJERCIK, 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, 29 abr. 2022.

YUAN, Y. et al. HPV post-infection microenvironment and cervical cancer. **Cancer Letters**, v. 497, p. 243–254, 28 jan. 2021.

ZAGAMI, P.; CAREY, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. **Breast Cancer**, v. 8, n. 1, 20 ago. 2022.

ZHANG, X. Molecular Classification of Breast Cancer: Relevance and Challenges. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 147, n. 1, p. 46–51, 22 set. 2022.

ZHAO, H. The Prognosis of Invasive Ductal carcinoma, Lobular Carcinoma and Mixed Ductal and Lobular Carcinoma According to Molecular Subtypes of the Breast. **Breast Cancer**, v. 28, 18 ago. 2020.

ZHAO, J. et al. Exogenous lipids promote the growth of breast cancer cells via CD36. **Oncology Reports**, v. 38, n. 4, p. 2105–2115, abr. 2017.

ZHAO, L. et al. An integrated analysis identifies STAT4 as a key regulator of ovarian cancer metastasis. **Oncogene**, v. 36, n. 24, p. 3384–3396, 23 jan. 2017.

ZHU, M. et al. The STAT family: Key transcription factors mediating crosstalk between cancer stem cells and tumor immune microenvironment. **Seminars in Cancer Biology**, v. 88, p. 18–31, jan. 2023.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1288, n. 2, p. F55-78, 1996.