



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS

JOSÉ ROOSEVELT CAVALCANTE

ASSOCIAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA COM A INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): EVIDÊNCIA MOLECULAR

FORTALEZA

2018

JOSÉ ROOSEVELT CAVALCANTE

ASSOCIAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA COM A INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): EVIDÊNCIA MOLECULAR

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro (UFC)

Co-orientador: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota (UFC)

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C364a Cavalcante, José Roosivelt.

Associação do Câncer de Mama com a Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV):
Evidência Molecular / José Roosivelt Cavalcante. – 2018.
124 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro.

Coorientação: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.

1. Neoplasias da mama. 2. Câncer de mama. 3. Papilomavírus humano. 4. HPV. 5. PCR. I.
Título.

CDD 617

JOSÉ ROOSEVELT CAVALCANTE

ASSOCIAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA COM A INFECÇÃO PELO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): EVIDÊNCIA MOLECULAR

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-Cirúrgicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Cristiane Cunha de Freitas (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Universidade Federal do Ceará

Dr. Paulo Henrique Diógenes Vasques
Grupo de Educação e Estudos Oncológicos (GEEON)

Dr. Fábio Rocha Fernandes Távora
Hospital do Coração e do Pulmão de Messejana

Aos meus pais Quintino e Idilva. À minha esposa Régina. Aos meus filhos e genros Iula e Rodrigo, Aline e Tiago, Igor, Adèle e Júlia. À minha neta Cecília. Aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro, com sua inesgotável curiosidade científica, por ter acolhido minha insistência em realizar esta pesquisa.

À Profa. Cristiane Cunha Frota que acreditou no desafio deste projeto e não hesitou em disponibilizar o Laboratório de Micobactérias do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará para a execução dos experimentos.

Aos Professores Paulo Roberto Carvalho de Almeida e Márcia Valéria Pitombeira Ferreira pela valiosa interpretação das lâminas de exames histopatológicos.

À Profa. Régia Maria Vidal Patrocínio e toda sua atenciosa equipe do Laboratório Biopse pelo apoio no fornecimento de material para os controles de mamas normais.

À Profa. Maria Jânia Teixeira que no momento certo nos cedeu os biótomos (*punchs*) que possibilitaram a extração do material a partir dos blocos parafinados.

Aos estudantes bolsistas da Faculdade de Medicina, Bruno Masato Kitagawa de Oliveira, Lara Mulato Lima, Laura Magda Costa Feitosa pelo suporte na coleta de dados dos prontuários. Ao também bolsista Agostinho Câmara Pinheiro, que chegou posteriormente à equipe, mas mostrou todo interesse e disponibilidade nas atividades que intervieram na sequencia do andamento desta pesquisa.

À equipe do laboratório, Gizele Almada Cruz, Thales Alves Campelo e Caroliny Soares Silva pela inestimável participação nos experimentos. Também minha gratidão a Soraya de Oliveira Sancho e Maria do Socorro Souza Santos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele insistentes e precisas nas informações incessantemente enviadas.

À Glicia Queiroz, colaboradora indispensável na coleta de lâminas e dos blocos parafinizados do arquivo do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Ceará.

A todo o pessoal das secretarias de Pós-Graduação e de Graduação do Departamento de Patologia e Medicina Legal /DPML/UFC, Valéria Cordeiro de Oliveira, Francisca Maria da Conceição Pereira, Cássia Lilian Soares de Almeida, Maria de Fátima Maia de Andrade Lima e Karoline Lima do Nascimento.

A toda equipe da Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Norma de Carvalho Linhares, Rosane Maria Costa, Raimundo César Campos do Nascimento, Valder Cavalcante Maia, Bernardo Silveira Mendes, Ulisses Vieira Rocha, Erika Leite Fernandes, Eliene Gomes Vieira Nascimento, Maria Dolores Prado Carvalho e Denise Barbosa dos Santos

Ao grande amigo Luiz Gomes Rodrigues, forte bastião, permanente conselheiro e irmão nestes tempos recentes, nas minhas jornadas da Maternidade Escola Assis Chateaubriand e de toda Pós-Graduação.

Ao grande amigo e colega João Paulo Aguiar Sampaio, entusiasta e incentivador deste projeto, desde o seu nascedouro.

À minha prima Kátia Bezerra Lira que 'trouxe' o seu pai, e meu querido tio, Hiderval Gomes Leite (*in memoriam*) para assistir minha Defesa de Doutorado.

“Você nunca sabe que resultados virão de sua ação, mas, se não fizer nada, não existirão resultados” (Mahatma Ghandi).

RESUMO

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres em todo o mundo. Aproximadamente 1,79 milhões de casos novos foram esperados para o ano de 2015 com 560.407 mortes estimadas para este mesmo ano no planeta. No Brasil, para cada ano do biênio 2018-2019, foram previstos cerca de 59.700 novos casos de câncer de mama. Apesar de alguns fatores de risco como a idade, hormônios, álcool, dieta e história familiar serem associados ao câncer mamário, para a maioria dos casos a causa inicial permanece sem explicação. A etiologia viral para o câncer de mama tem sido considerada e, neste sentido, a identificação de um possível agente viral relacionado a esta doença tem sido fonte de motivação para pesquisadores há décadas. O Papilomavírus humano (HPV) além de estar presente em mais de 99% dos carcinomas cervicais uterinos, já é também considerado um dos principais fatores de risco para muitos carcinomas penianos, vulvares, vaginais e anais e crescente fração de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Estudos recentes também documentam a presença do DNA do HPV em cânceres de mama. Este trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência e o tipo predominante de HPV em amostras de câncer mamário. MÉTODOS: Cento e três amostras de carcinomas mamários e noventa e cinco de mamas normais, como grupo de controle não maligno, foram examinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com os iniciadores de consenso MY09/MY11 e GP5+/GP6+ em reação *nested* para a região L1 do HPV, seguida por nova PCR, do tipo *nested* multiplex, para região de consenso E6/E7 do HPV com o objetivo de identificar tipos específicos. RESULTADOS: O DNA do HPV foi detectado em 49,5% dos carcinomas mamários e em 15,8% das mamas normais ($p < 0,0001$). Os HPV 6/11 foram encontrados em 13,7% dos cânceres de mama HPV positivos. Os cânceres mamários positivos para o DNA do HPV foram observados com maior frequência no grupo mais jovem (<42 anos). CONCLUSÃO: A elevada positividade para o DNA do HPV encontrada nos carcinomas mamários deste estudo e sua presença, não rara, em mamas de mulheres sem câncer, pode indicar um provável papel do HPV no câncer de mama humano.

Palavras-chave: Neoplasias da mama, Câncer de mama, Papilomavírus Humano, HPV, Reação em cadeia da polimerase, PCR.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer among women worldwide. Approximately 1.79 million new cases were expected for 2015 with 560,407 deaths estimated for this same year in the planet. In Brazil, for each year of the 2018-2019 biennium, some 59,700 new cases of breast cancer were predicted. Although some risk factors such as age, hormones, alcohol, diet and family history are associated with breast cancer, for the majority of cases the initial cause remains unexplained. The viral etiology for breast cancer has been considered and the identification of a possible viral agent related to this disease has been a source of motivation for researchers for decades. Human papillomavirus (HPV), besides being present in more than 99% of cervical carcinomas, is already considered to be a major risk factor for many penile, vulvar, vaginal and anal carcinomas and a growing fraction of head and neck squamous cell carcinomas. The HPV presence in breast cancer tissue has been already reported in recent studies. The aim of this study was to investigate the occurrence and the predominant type of HPV in breast cancer tissue. **METHODS:** One hundred three cases of breast carcinomas and ninety-five normal breast samples, as a non-malignant control group, were examined by a nested polymerase chain reaction (PCR) with the MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primers targeting the L1 region of HPV, followed, in a second round, by a nested a multiplex PCR (NMPCR) with type specific primers for the E6-E7 region of the HPV. **RESULTS:** The HPV DNA was detected in 49,5% breast carcinoma and in 15,8% normal breast ($p < 0,0001$). HPVs 6/11 were found in 13.7% of HPV positive breast cancers. HPV positive breast cancers were observed more frequently in the younger women (<42 years). **CONCLUSION:** The high proportion of HPV positive breast cancers detected in this study and its presence, not rare, in breasts of women without cancer may indicate a likely causal role for HPV in human breast cancer.

Keywords: Breast neoplasms, Human papillomavirus, HPV, Polymerase chain reaction, PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação espacial das taxas de incidência do Câncer de Mama no Brasil por 100 mil mulheres estimadas para o biênio 2018-2019.....	18
Figura 2 - Morfologia do HPV em microscopia eletrônica.....	24
Figura 3 - Genoma do HPV.....	25
Figura 4 - Seleção do material de arquivo de lâminas e blocos parafinizados.....	37
Figura 5 - Coleta do material de arquivo de lâminas e blocos parafinizados.....	38
Figura 6 - Preparo da reação da polimerase em cadeia no laboratório de Micobactérias do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará.....	42
Figura 7 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores MY09/MY11 e β -globina PC04 e GH20.....	47
Figura 8 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores GP5+/GP6+.....	48
Figura 9 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B do gene E6-E7 do HPV.....	49
Figura 10 - Figura 10 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores tipo-específicos Mix 2 (HPV tipos 33, 6/11, 58, 52 e 56) do gene E6-E7 do HPV.....	50
Figura 11 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores tipo específicos Mix 2 (HPV tipos 33, 6/11, 52, 56 e 58) do gene E6-E7 do HPV.....	51
Figura 12 - Eletroferograma da amostra 35 de MN (HPV positiva), evidenciando a qualidade do DNA.....	51
Figura 13 – Representação dos resultados positivos e negativos do DNA do HPV em CM e MN.....	54

Figura 14 - Representação da distribuição dos resultados positivos para o DNA do HPV nos CM e nas MN, segundo o genótipo.....	55
Figura 15 – Todos os HPVs genotipados em CM e MN comparados à todos HPVX em CM e MN.....	56
Figura 16 – Pesquisa de alinhamento da sequência da amostra 35 de MN (HPV positiva) no NCBI.....	58
Figura 17 – Pesquisa de alinhamento da sequência do controle positivo de HPV do condiloma vulvar no NCBI.....	59
Figura 18 - Alinhamento do sequenciamento da região E6-E7 do HPV da amostra 35 de MN (HPV positiva) com a referência HPV tipo 11 isolado 83A.11 (GenBank Nº KU298879.1) no NCBI.....	59
Figura 19 - Alinhamento do sequenciamento da região E6-E7 do HPV da amostra do controle positivo de condiloma vulvar com a referência HPV-16 E6/E7 gene da proteína de fusão (GenBank Nº FJ229356.1) no NCBI.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos Iniciadores de consenso para MY09/MY11 e GP5+/GP6+ e para a β -globina.....	41
Tabela 2 - Sequências dos iniciadores de consenso para as regiões E6 e E7 do HPV.....	43
Tabela 3 - Sequências de iniciadores para os 11 tipos específicos de HPV por PCR <i>nested</i>	44
Tabela 4 – Todos os CMs do estudo distribuídos por tipo de tumor histológico e com os resultados positivos e negativos para o DNA do HPV com relação a cada tipo histológico.....	52
Tabela 5 - Todos os CMs positivos e negativos para o DNA do HPV distribuídos por tipo de tumor histológico e por grau do sistema de graduação para carcinoma de mama conforme Scarff-Bloom e Richardson - SBR) modificado por Elston e Ellis.....	53
Tabela 6 - PCR com os iniciadores MY/GP e E6-E7 e resultados positivos e negativos encontrados para o DNA do HPV no CM e na MN.....	54
Tabela 7 - Distribuição do HPV por genótipos e por grupo de risco para carcinogênese, nos resultados HPV positivos dos CM e das MN.....	55
Tabela 8 – Todas as ocorrências HPV positivas nos CM e nas MN distribuídas de acordo com a faixa etária.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	<i>American Cancer Society</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BRCA	<i>Breast Cancer gene (1 e 2)</i>
CCECP	Câncer de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CLI	Carcinoma Lobular Invasivo
CM	Câncer de mama
E	<i>Early</i>
E1	<i>Early region 1 (Oncogene do HPV)</i>
E2	<i>Early region 2 (Oncogene do HPV)</i>
E5	<i>Early region 5 (Oncogene do HPV)</i>
E6	<i>Early region 6 (Oncogene do HPV)</i>
E7	<i>Early region 7 (Oncogene do HPV)</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
GP	GP5+ e GP6+ - Iniciadores utilizados em PCR
HE	Hematoxilina – Eosina (método de coloração laboratorial)
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HR	<i>Hormone Receptors</i>
HERV	<i>Human Endogenous Retroviruses</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	<i>Late</i>
L1	<i>Late region1 (Oncogene do HPV)</i>
L2	<i>Late region 2 (Oncogene do HPV)</i>
LCR	<i>Long Control Region</i>
MEAC	Maternidade Escola Assis Chateaubriand
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
MN	Mama normal
MY	MY09 e MY11 – Iniciadores utilizados em PCR

NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIV	Neoplasia Intraepitelial Vulvar
nm	Nanômetro
PB	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pM	Picomolar
pRb	Proteína do Retinoblastoma
p53	Proteína 53 (proteína de massa molecular = 53 kDa)
UFC	Universidade Federal do Ceará
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
VIN	<i>Vulvar Intraepithelial Neoplasia</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Câncer de Mama - aspectos epidemiológicos.....	17
1.2	Estratégias e condutas recomendadas para a prevenção e detecção precoce do Câncer Mamário.....	19
1.3	Fatores de risco mais discutidos para a origem do câncer mamário.....	21
1.4	Carcinogênese Humana.....	22
1.5	O Papilomavírus Humano - <i>Human Papillomavirus (HPV)</i>	24
1.5.1	Transmissão do HPV.....	27
1.5.2	O Ciclo do HPV.....	28
1.6	HPV e Cânceres Humanos.....	29
1.6.1	HPV e câncer de colo uterino.....	29
1.6.2	HPV e câncer vulvar.....	30
1.6.3	HPV e câncer vaginal.....	30
1.6.4	HPV e câncer de pênis.....	30
1.6.5	HPV e câncer anal.....	31
1.6.6	HPV e câncer de células escamosas de cabeça e pescoço.....	31
1.7	HPV e Câncer de Mama.....	32
2.	OBJETIVOS.....	35
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.	RESULTADOS.....	47
5.	DISCUSSÃO.....	61
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP).....	92
	ANEXO B – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO EMITIDO PELA MATERNIDADE ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAND (MEAC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.....	95
	ANEXO C – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO EMITIDO PELO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL DA FACULDADE	

DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (DPML/FAMED/UFC).....	96
ANEXO D – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO EMITIDO PELO LABORATÓRIO BIOPSE.....	97
ANEXO E – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOLOGIA REALIZADO EM CURITIBA (PR) - 2015.....	98
ANEXO F - MENÇÃO HONROSA NO XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOLOGIA REALIZADO EM CURITIBA (PR) – 2015.....	99
ANEXO G - CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO <i>CLINICS</i>	100
ANEXO H – VERSÃO ORIGINAL DO ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO PELO PERIÓDICO <i>CLINICS</i>	101
APÊNDICE A – DADOS BRUTOS DE TODOS OS CÂNCERES DE MAMAS (CM, N=103) DA PESQUISA EXIBINDO IDADE, CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E POSITIVIDADE OU NEGATIVIDADE PARA O DNA DO HPV.....	121
APÊNDICE B – DADOS BRUTOS COM TODAS AS AMOSTRAS DE MAMAS NORMAIS (MN, N=95) DA PESQUISA EXIBINDO IDADE E POSITIVIDADE OU NEGATIVIDADE PARA O DNA DO HPV.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama - aspectos epidemiológicos

O câncer de mama é o tumor mais comum e a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (BECKER, 2015; WHO, 2017). Nos países mais ricos a incidência tem aumentado devido à melhora na expectativa de vida. Apesar de ser possível alcançar uma redução do risco através da prevenção, esta estratégia não tem conseguido eliminar a maior parte dos cânceres de mama nos países de baixa e de média renda onde esta doença é diagnosticada em estágios muito tardios (WHO, 2017).

Até agora o único método de rastreamento do câncer de mama que se mostrou efetivo é a mamografia. É um recurso complementar caro, mas eficaz e factível em países com boa infraestrutura de saúde. Muitos países de baixa e média renda que enfrentam ao mesmo tempo a incidência dos cânceres, cervical e mamário, precisam adotar intervenções combinadas e de custo acessível para combater estas doenças altamente evitáveis (WHO, 2017).

Aproximadamente 1,79 milhões de novos casos foram estimados para o ano de 2015 com 560.407 mortes previstas para este mesmo ano no planeta. Estas frequências correspondem a 25% de todos os tipos de cânceres mundiais femininos (GLOBOCAN, 2012). Estes números refletem a magnitude da incidência do câncer de mama, seu efeito na sociedade em todo o mundo e a necessidade de urgência na procura de soluções preventivas e de tratamento (TAO *et al.*, 2015).

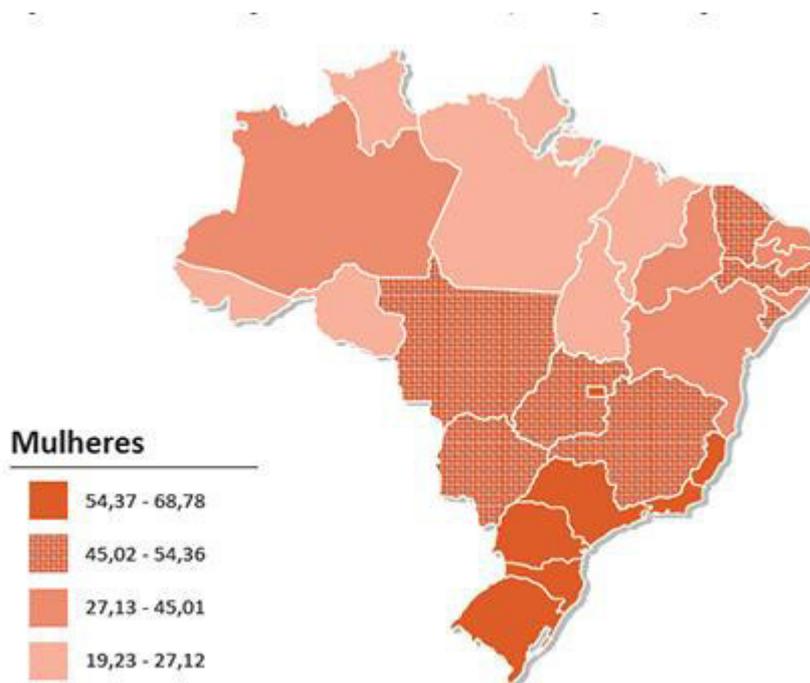
Esta neoplasia apresenta-se com incidências diferentes nas regiões do mundo tendo mostrado taxas que variam de 27/100.000 na África Central e Ásia Oriental a 92/100.000 na América do Norte (GLOBOCAN 2012). Nos Estados Unidos, para 2017, casos novos e mortes por câncer de mama nas mulheres foram estimados em 252.710 e 40.610 respectivamente (ACS, 2017).

A *American Cancer Society* (ACS, 2015) registra que a taxa de incidência do câncer mamário diminuiu quase 7% entre as mulheres brancas de 2002 para 2003, e, atribui esta queda às reduções no uso de terapia hormonal da menopausa, previamente conhecida como terapia de reposição hormonal (TRH), após a divulgação, em 2002, de que o uso combinado de estrogênios e progesterona estava associado com crescente risco de câncer mamário e doença coronariana. De

2004 a 2013, os mais recentes 10 anos para os quais os dados são disponíveis, as taxas de incidência nas mulheres brancas permaneceram estáveis e aumentaram cerca de 0,5% por ano nas mulheres negras (ACS, 2017).

No Brasil, para cada ano do biênio 2018-2019, foram previstos cerca de 59.700 novos casos de câncer de mama o que equivale a um risco estimado de 56,33 casos para cada 100 mil mulheres. Excetuando os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2018).

Figura 1 - Representação espacial das taxas de incidência do Câncer de Mama no Brasil por 100 mil mulheres estimadas para o biênio 2018-2019



Fonte: INCA, 2018.

É uma doença que constitui uma pesada carga para os sistemas de saúde: os programas de rastreamento têm custos elevados e de difícil organização envolvendo as razões de logística e de qualidade. O tratamento cirúrgico apropriado requer instalações adequadas com profissionais de saúde altamente qualificados. Abordagens mais avançadas de tratamento, como a radioterapia, envolvem infraestruturas que estão além do alcance da maioria dos sistemas de saúde dos

países de população de baixa renda. Além disso, tanto a quimioterapia como a hormonioterapia são também de elevado custo. Em suma, todo o sofisticado tratamento do câncer de mama necessita de recursos de tecnologia avançada, incluindo a imunohistoquímica e análises de patologia molecular. Enquanto novas terapias específicas continuam a surgir num campo em constante evolução, a única certeza existente é a de que os custos dos tratamentos individuais continuam a ser um desafio mesmo para os mais ricos sistemas de saúde (BECKER, 2015).

1.2 Estratégias e condutas recomendadas para a prevenção e detecção precoce do Câncer Mamário

O câncer de mama representa uma tragédia individual para aqueles acometidos pela doença. Altos índices de cura podem ser alcançados quando da detecção precoce e, ao contrário, torna-se uma doença mortal quando descoberta muito tarde. O acesso aos cuidados de alta qualidade levando ao diagnóstico na fase inicial da doença, assim como a um apropriado tratamento médico e cirúrgico fazem a diferença entre vida e morte (BECKER, 2015). Estudos epidemiológicos ressaltam que abordar as questões socioeconômicas é de extrema importância, de modo que todas as mulheres tenham igual acesso a assistência médica, desde o rastreamento até o tratamento avançado (TAO *et al.*, 2015).

Os cuidados de prevenção primária desta doença envolvem medidas comportamentais de saúde como uma alimentação saudável e atividades físicas moderadas ou vigorosas e manutenção de um saudável peso corporal e da não ingestão de álcool (LACEY, 2009; WHO, 2015; ACS, 2016). A adoção destes hábitos poderia prevenir cerca de um quarto dos casos de câncer de mama nos países de baixa renda, segundo a Fundação Internacional para a Pesquisa de Câncer no Mundo (*World Cancer Research Fund International*, 2016). Em particular, elevados níveis de consumo de frutos e vegetais podem reduzir o risco do câncer mamário HR-negativo (JUNG *et al.*, 2013; De SANTIS *et al.*, 2016). Estes achados têm apoio em outros estudos associando os elevados níveis de carotenoides sanguíneos com um menor risco para o câncer mamário (ELIASSEN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016).

Atitudes associadas à diminuição de risco para o câncer mamário também incluem o aleitamento por pelo menos um ano (LACEY, 2009; WHO, 2015; ACS, 2016). De acordo com o Grupo de Colaboração sobre Fatores Hormonais no Câncer Mamário (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2002), o risco

para o câncer de mama pode ser reduzido em 4% para cada 12 meses de amamentação. Este efeito protetor pode ser mais intenso e mais relacionado aos cânceres mamários triplo-negativos (PALMER *et al.*, 2014).

Para o rastreamento, é recomendado que mulheres já a partir dos 20 anos sejam orientadas para o autoexame e atualizadas a cada visita periódica. Entre 20 a 39 anos de idade o exame clínico deve ser realizado pelo menos a cada 3 anos. As mulheres assintomáticas acima de 40 anos devem continuar os exames clínicos, preferivelmente a cada ano (ACS, 2015). A detecção precoce com a mamografia ajuda a salvar vidas, entretanto, como qualquer ferramenta de rastreamento, a mamografia não é perfeita. Por exemplo, pode não detectar cânceres em portadoras do tumor (falso negativo), particularmente em mulheres com mamas muito densas. A mamografia também pode parecer anormal na ausência de câncer (falso positivo). Entre os 10% de mulheres que têm mamografias anormais, a maioria não tem câncer (ACS, 2017).

Para as mulheres sem história familiar para o câncer de mama, recomendações de triagem recentemente atualizadas aconselham que aquelas com idade de 40 a 44 anos podem ter a escolha de fazer a mamografia anual; as mulheres de 45 a 54 anos devem realizar a mamografia anualmente; e aquelas de 55 anos ou mais, podem se submeter a mamografia a cada dois anos ou anualmente, continuando enquanto tiverem saúde geral boa e expectativa de vida de 10 anos ou mais. Com relação às mulheres com alto risco para desenvolver o câncer mamário, além da mamografia anual, é recomendado o exame de ressonância magnética iniciando aos 30 anos (ACS, 2017).

No Brasil a estratégia que tem sido adotada para a detecção precoce inclui a mamografia a cada dois anos para mulheres de 50 a 69 anos. Já para grupos populacionais de risco elevado com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau, é aconselhado o exame clínico individualizado (INCA, 2016; INCA, 2018).

Também têm sido ampliadas as vias de comunicação buscando alertar todas as mulheres sobre os principais fatores de risco, esclarecendo sobre os sinais e sintomas mais frequentes da doença, além de priorizar a formação de profissionais de saúde capacitados para avaliar os casos suspeitos assim como proporcionar sistemas e serviços de saúde preparados para garantir a confirmação diagnóstica oportuna (INCA, 2018).

Apesar dos inúmeros avanços tecnológicos, na gestão da saúde e nas ciências médicas, terem sido feitos para a detecção e tratamento precoces visando prevenir o progresso da doença para o estado metastático, há muitas questões sem respostas no que diz respeito ao mecanismo molecular relacionado à agressividade de certas formas desta doença (TAO *et al.*, 2015).

1.3 Fatores de risco mais discutidos para a origem do câncer mamário

Os fatores potencialmente modificáveis associados ao aumento do risco de câncer de mama incluem o ganho de peso após os 18 anos e/ou sobrepeso ou obesidade (para o câncer mamário da pós-menopausa); o uso de terapia hormonal da menopausa (com estrógenos e progestágenos combinados); inatividade física e consumo de álcool. O tabagismo crônico intenso aumenta o risco de câncer mamário, particularmente entre mulheres que começam a fumar antes da primeira gravidez. O trabalho por turnos, principalmente à noite (que quebra os padrões do sono) pode também ser associado com um risco aumentado para o câncer de mama (ACS, 2017; CHUFFA *et al.*, 2017).

Os fatores não modificáveis relacionados ao aumento de risco para o câncer mamário incluem idade avançada; história pessoal ou familiar de câncer ovariano; herança genética de mutações de alguns genes; a alta densidade do tecido mamário (representada pela relação entre o tecido glandular mamário propriamente dito e o tecido adiposo mensurado pela mamografia); a alta densidade mineral óssea (avaliada pela densitometria óssea); o diabetes tipo 2, algumas condições benignas da mama (como a hiperplasia atípica); história de carcinoma ductal ou lobular *in situ* e altas doses de radiação do tórax, em idades jovens. Também aumentam o risco, fatores da vida reprodutiva como a prolongada exposição aos estrógenos endógenos (que incluem longa história menstrual com períodos que se iniciam muito cedo - menarca precoce, e terminam tarde - menopausa tardia) na vida da mulher, o uso recente de contraceptivos orais. O fato de nunca ter tido filhos ou de ter o primeiro parto após os 30 anos são também condições de aumento de risco para o câncer mamário (BECKER, 2015; ACS, 2017). No entanto, todos estes eventos representam apenas 20-50% das causas deste tumor, sendo esta uma das razões do aumento de interesse dos pesquisadores na busca de outros fatores que possam levar ao câncer de mama (De LIMA *et al.*, 2016; CHUFFA *et al.*, 2017).

A história familiar de câncer mamário está associada a um aumento do risco para esta neoplasia. Em particular, famílias portando mutações dos genes BRCA1, BRCA2 e p53 têm risco mais elevado para desenvolver este tumor. No entanto, estas mutações são raras e representam pequena parcela no total de cânceres mamários. Aproximadamente nove em cada 10 casos ocorrem em mulheres que não têm história familiar (YOUNG, 2009; ALIBEK, 2013; WHO, 2015; INCA, 2016).

Uma causa infecciosa para o câncer de mama humano começou a ser admitida a partir do estudo de Bittner (1943), demonstrando que o vírus do tumor mamário do rato (MMTV) estava associado a incidência do câncer de mama nestes roedores. Nesta ocasião, os cientistas começaram a postular que o câncer mamário humano também poderia ser de origem viral. Em 1964, pela primeira vez, foi comprovada a etiologia infecciosa por vírus (EBV) de um câncer humano (linfoma de Burkitt). Em seguida foram reconhecidas como oncogênicas outras viroses humanas: HPV (carcinoma cervical uterino), vírus das hepatites B e C (carcinoma hepatocelular primário), vírus linfotrópico tipo-1 das células T humanas (leucemia das células T do adulto), herpes-vírus-8 humano (sarcoma de Kaposi) e o vírus das células de Merkel (câncer das células de Merkel) (JOSHI; BUEHRING, 2012).

A maioria dos cânceres de mama é constituída por carcinomas, tumores malignos oriundos de células epiteliais, que perfazem em torno de 80% dos cânceres humanos e quase todos eles permanecem com etiologia desconhecida. O interesse em HPVs de alto risco oncogênico como candidatos a causa do câncer mamário cresceu depois que Band *et al.* (1990) obtiveram a imortalização das células epiteliais mamárias humanas normais por meio da transfecção, para estas células, do DNA dos HPVs 16 e 18, tendo concluído que este vírus poderia estar relacionado ao câncer mamário (SIMÕES *et al.*, 2012).

1.4 Carcinogênese Humana

A maioria dos tumores sólidos humanos exibe evidências de aberrações cromossômicas, notadamente aneuploidia. A perturbação da estabilidade genética é considerada como o principal pré-requisito para a carcinogênese humana, caracterizando-a como uma doença de instabilidade genômica - conjunto de eventos moleculares que habilita as células a adquirirem alterações genéticas

imprescindíveis para a sobrevivência e expansão clonal num microambiente de um neoplasma emergente (MUNGER *et al.*, 2004). Entre as características indispensáveis para que as células alteradas continuem favorecendo a progressão tumoral, destacam-se, a capacidade de proliferar indefinidamente e de evitar a apoptose. Além disso, a carcinogênese é uma doença que envolve também importantes modificações no relacionamento entre os vários tipos de células que compõem o microambiente tumoral (BRIAND; LYKKESFELDT, 2001; ARIZTIA *et al.*, 2006). Estas modificações nas células estromais podem preceder as mudanças genômicas das células epiteliais que levam à gênese tumoral. Assim, o desenvolvimento de um câncer requisita, ao mesmo tempo, modificações específicas do genoma, falha de mecanismos de defesa ao nível da célula, do microambiente e do organismo (ARIZTIA *et al.*, 2006; MONIER; TUBIANA, 2008).

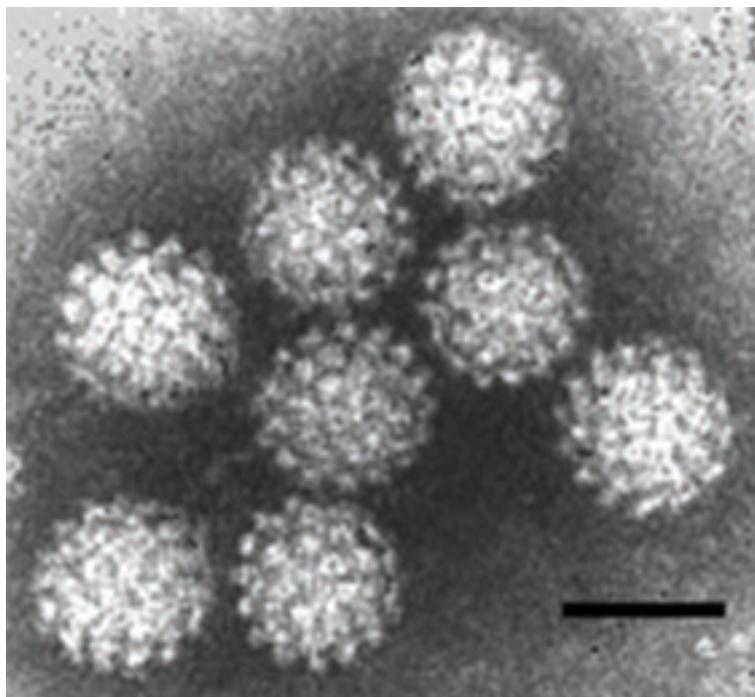
A carcinogênese é considerada como um processo de múltiplos estágios envolvendo ativação, mutação ou perda de diferentes genes resultando numa sequência anormal de padrões de crescimento que vão desde a condição benigna, depois a pré-maligna e *in situ*, até a invasão dos tecidos vizinhos, seguida pela disseminação metastática, sendo, esta etapa, amplamente favorecida pela angiogênese (BEHRENS *et al.*, 1989; BRIAND; LYKKESFELDT, 2001; MONIER; TUBIANA, 2008).

Grande parte das pesquisas de câncer nos humanos tem sido efetuada em cânceres invasivos e metastáticos, ou seja, em estádios tardios. Tais estudos contribuem muito pouco para o esclarecimento das causas quando se sabe que os eventos cruciais da carcinogênese acontecem em estágios precoces. Modelos laboratoriais para o estudo das transformações malignas, apesar de muitas dificuldades em culturas com células humanas, têm sido úteis para o estudo dos eventos precoces na carcinogênese, e transformações malignas têm sido obtidas com sucesso através da exposição das células epiteliais normais a determinados agentes como carcinógenos químicos, irradiações, vírus tumorais ou oncogenes. Mesmo considerando que um destes agentes possa levar à imortalização celular, pelo menos dois deles são necessários para se obter a transformação maligna. Em geral, estes eventos são também válidos para o epitélio mamário humano (BEHRENS, *et al.*, 1989; BAND *et al.*, 1990; WAZER *et al.*, 1995, BRIAND; LYKKESFELDT, 2001).

1.5 O Papilomavírus Humano - *Human Papillomavirus (HPV)*

Os Papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae*. A partícula viral, denominada vírion, possui um envoltório proteico, o capsídeo, em torno do genoma viral. São estruturas circulares (Figura 2), não envelopadas medindo aproximadamente 55 nm de diâmetro que exibem notáveis semelhanças entre os diferentes tipos deste grupo de vírus. Estas estruturas não envelopadas tornam os papilomavírus bastante resistentes ao calor e aos solventes orgânicos (Zur HAUSEN, 1996; CAMARA *et al.*, 2003).

Figura 2 – Morfologia do HPV em microscopia eletrônica



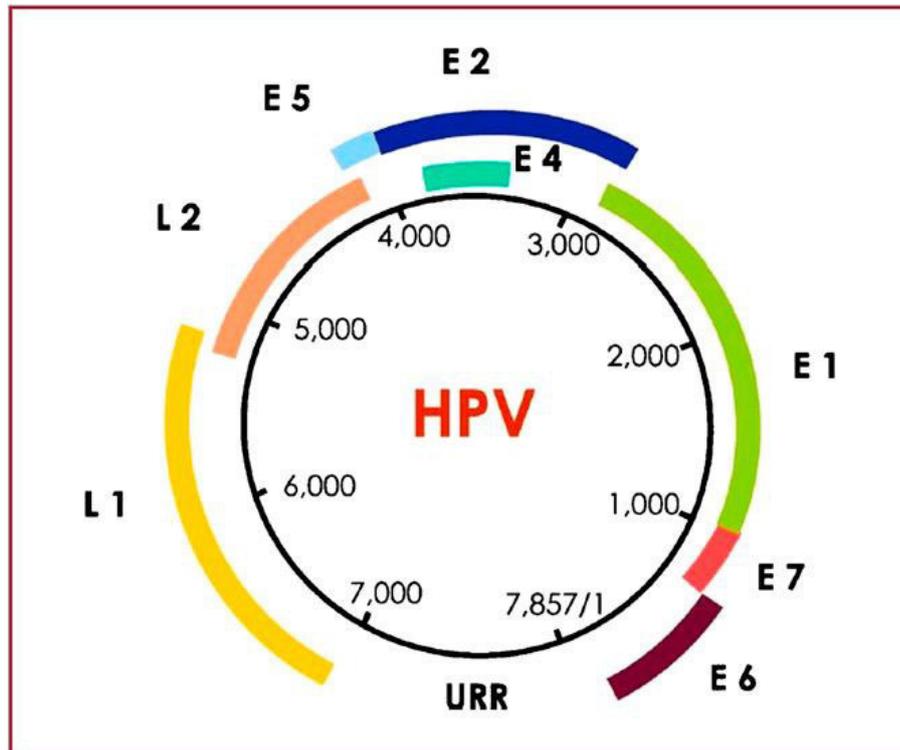
Fonte: SEGONDY, 2013

Barra de escala: 50 nm

O genoma do HPV (Figura 3) consiste de uma molécula em dupla fita de aproximadamente 8000 pares de base (pb) e possui uma biologia muito complexa. A organização da informação genética é compacta e pode ser dividida em três regiões: uma das fitas é codificante e é subdividida nas regiões precoce - *early*, (E) e tardia - *late* (L). Entre estes dois conjuntos de genes encontra-se a região não codificante denominada região longa de controle – *long control region*, LCR ou *upstream regulatory region*, URR, compreendendo em torno de 10% do genoma. Esta região contém fatores de regulação da origem da replicação e da expressão dos genes moduladores da transcrição viral. Todos os HPVs mantêm a mesma organização

genômica mesmo que haja variações no tamanho e na sequência dos genes e das LCRs. As denominações “E” e “L” fazem referência à fase do ciclo da vida do vírus em que estas proteínas começam a se expressar (CAMARA *et al.*, 2003; De VILLIERS *et al.*, 2004; IARC Monographs, 2012; EIDE; DEBAQUE, 2012).

Figura 3 - Genoma do HPV



Fonte: EIDE; DEBAQUE, 2012. Representação esquemática do genoma do HPV mostrando a organização dos genes “E”, “L” e da região reguladora “LCR” ou “URR”.

A região “E” codifica as proteínas não estruturais. As proteínas E1 e E2 modulam a replicação e a transcrição do DNA viral. A oncoproteína E4 interage com o citoesqueleto de queratina e é responsável pela maturação dos vírions além de facilitadora da liberação do vírus. A proteína E5 participa na fase produtiva do ciclo de vida viral (De VILLIERS *et al.*, 2004; IARC Monographs, 2009; EIDE; DEBAQUE, 2012). A oncoproteína E6 tem a propriedade de se ligar e degradar a proteína supressora tumoral p53, resultando na inibição de sua atividade regulatória com consequente interrupção do processo de apoptose. Esta proteína também previne a diferenciação celular e interage com fatores de replicação e de reparo do DNA. A oncoproteína E7 se associa e degrada a proteína pRb. Desta forma, intervém nas vias de regulação do ciclo celular - em condições normais, controlada pela proteína

pRb - e propicia um ambiente favorável para a replicação do DNA viral levando à proliferação celular descontrolada (IARC Monographs, 2009; SEGONDY, 2013; CANTALUPO; KATZ; PIPAS, 2018).

A região “L” codifica as duas proteínas estruturais do capsídeo viral; L1 e L2. Estas proteínas são responsáveis pela imunogenicidade e são portadoras de fatores antigênicos gênero-específicos. L1 é a maior e principal proteína estrutural e é altamente conservada em todos os tipos de papilomavírus. Nos últimos quinze anos, tem sido a partir do conhecimento da sequência de bases deste gene que novos tipos de HPV são identificados e classificados (CAMARA *et al.*, 2003; De VILLIERS *et al.*, 2004; IARC Monographs, 2007; EIDE; DEBAQUE, 2012).

Os critérios para a classificação deste vírus se fundamentam na comparação com as sequências de nucleotídeos do gene L1. Por definição, cada genótipo de HPV difere, na sequência do DNA de L1, em pelo menos 10% de qualquer um de todos os outros já conhecidos. Quando a diferença é menor que 2% o tipo é denominado de variante e entre 2 a 10% é chamada de subtipo. Apesar da grande heterogeneidade deste grupo de vírus, tudo parece indicar que as mutações nos seus genomas são pouco frequentes mostrando a diversificação dos tipos desde tempos pré-históricos. Os números para cada um destes vírus são atribuídos de maneira sequencial conforme o momento de suas descobertas. Em razão das dificuldades para cultivá-los em células ou revelá-los em testes de neutralização que permitiriam a distinção entre sorotipos de vírus, a classificação dos HPVs é feita a partir das diferenças do próprio genoma. Por isto, os tipos não são denominados de sorotipos, mas sim de genótipos ou genótipos (Zur HAUSEN, 1996; CÂMARA *et al.*, 2003; IARC Monographs, 2007; MOUGIN; NICOLIER; DECRION-BARTHOD, 2008; LEE *et al.*, 2009).

Até o momento, mais de 200 genótipos do papilomavírus humano são conhecidos e novos tipos são regularmente adicionados a esta lista. Os dois principais gêneros são o alfa-HPV e o beta-HPV que compreendem cerca de 90% dos tipos atualmente já caracterizados. O maior grupo é o do alfa-HPV que inclui os HPVs genitais (DOORBAR, 2006; CARTER; DING; ROSE, 2011; MUNGER; JONES, 2015; SOHRABI *et al.* 2017). Conforme tropismo pelo tipo de tecido, os HPVs são divididos nos tipos mucosos e cutâneos. Os do tipo mucoso são classificados como “baixo risco oncogênico” e “alto risco oncogênico” de acordo com a propensão para a progressão maligna das lesões que podem causar (MUNGER *et al.*, 2004;

MUNGER; JONES, 2015). Entre os HPVs genitais, são considerados de alto risco os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e o tipo 68 sendo considerado como provavelmente carcinogênico (De MARTEL *et al.* 2017). Em particular, os tipos 16 e 18 são responsáveis por mais de 70% dos cânceres da cérvix uterina e, acima de 99% destas neoplasias contêm sequências virais do HPV. Nestas lesões, os genes E5, E6 e E7 são responsáveis pela produção de oncoproteínas virais relacionadas à iniciação e progressão do câncer cervical. Os tipos oncogênicos mais frequentemente encontrados no câncer de colo uterino (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58) e quatro tipos menos constantemente encontrados (HPV-39, 51, 56, 59) foram classificados carcinogênicos para os humanos (BASEMAN; KOUTSKY, 2005; BOUVARD *et al.*, 2009; IARC, 2009; CARBONE; De PAOLI, 2012).

1.5.1 Transmissão do HPV

O modo mais comum da transmissão horizontal das infecções pelo HPV é através do contato direto pele-pele ou pele-mucosa. Está inequivocamente demonstrado que o maior fator de risco para a aquisição da infecção pelo HPV é comportamental, através do contato sexual com parceiro infectado sabendo-se que o número de parceiros tem um papel determinante para a aquisição desta infecção em ambos os sexos. Contudo, com base em estudo realizado com mulheres que fazem sexo com mulheres, pode-se presumir que a relação com penetração peno-vaginal não é estritamente necessária (MARRAZZO; STINE; KOUTSKY, 2000; MARRAZZO *et al.*, 2001; IARC MONOGRAPHS, 2009).

Além disso, a transmissão pode ter lugar num determinado sítio anogenital, tal como o introito, e a infecção ser espalhada por auto-inoculação para outro local. A mais elevada incidência da infecção pelo HPV acontece em adolescentes e jovens adultos. O aumento de idade está ligado a uma diminuição na aquisição das infecções ano-genitais pelo HPV como consequência, talvez, da diminuição do número de parceiros e, também, possivelmente relacionado a uma imunidade adquirida através de infecções prévias. Práticas sexuais como o sexo oral, a relação digital-vaginal ou aquelas com inserção de utensílios sexuais podem também transmitir a infecção pelo HPV (EDWARDS; CARNE, 1998; SONNEX; STRAUSS; GRAY, 1999; GERVAZ *et al.*, 2003; IARC MONOGRAPHS, 2007; IARC MONOGRAPHS, 2009; CARTER; DING; ROSE, 2011; SCHAFFER, 2015). De

acordo com Doorbar *et al.* (2012), mais de 80% das mulheres são infectadas pelo HPV em algum estágio de suas vidas.

O modo não sexual de transmissão do HPV genital continua sendo um assunto controverso. A maioria dos estudos realizados com mulheres jovens e sem experiência sexual demonstraram que a transmissão não sexual do HPV é incomum (ANDERSSON-ELLSTRÖM *et al.*, 1994; DILNER *et al.*, 1999). No entanto, outros estudos relataram que o HPV poderia ocasionalmente ser transmitido por outros modos além da atividade sexual (PAO *et al.*, 1992; CASON *et al.*, 1995; WINER *et al.*, 2003). Possíveis rotas não sexuais incluem a transmissão vertical, procedimentos médicos, fômites e contato de pele (MINDEL; TIDEMAN; 1999; FREGA *et al.*, 2003; IARC MONOGRAPHS, 2009; BODA *et al.*, 2018).

1.5.2 O ciclo do HPV

O ciclo biológico do HPV é estreitamente ligado ao programa de diferenciação do epitélio hospedeiro infectado. Seus vírions inicialmente penetram através de micro-abrasões até as células epiteliais basais que são as células menos diferenciadas e constituem a única camada do epitélio com atividade mitótica e em constante divisão. Estas células são consideradas como o principal alvo do papilomavírus humano (CÂMARA *et al.*, 2003; MUNGER, 2004; NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007; IARC Monographs, 2009).

Em seguida, via processo de endocitose, entram nas células basais. Pouco depois de penetrar na célula a capa proteica se decompõe e o DNA do vírus é direcionado ao núcleo onde permanece em modo epissomal, ou seja, separado do DNA do hospedeiro. Em alguns casos, no entanto, a integração e transformação podem ocorrer. O DNA do HPV, tipicamente se integra ao DNA do hospedeiro, por ruptura do gene E2 que faz com que o genoma circular se torne linear para possibilitar a integração. A ruptura de E2 mediada pela integração leva à cessação da síntese viral, porém de forma mais importante desencadeia o desequilíbrio de E6 e E7 que causam a acumulação de danos e mutações no DNA do hospedeiro, como a indução de anormalidades do centrôssoma, resultando na geração de defeitos mitóticos (mitoses tripolares) e aneuploidia, eventos que podem levar à instabilidade genética. As oncoproteínas E6 e E7 são fatores essenciais na carcinogênese induzida pelo HPV e suas habilidades de interferir com reguladores cruciais da

proliferação, apoptose, imortalização e estabilidade genômica promovem, coletivamente, o surgimento de uma população celular com potencial de crescimento e aumentada propensão para transformação e progressão maligna (MUNGER *et al.*, 2004; MOUGIN; NICOLIER; DECRION-BARTHOD, 2008; IARC MONOGRAPHS, 2009; MOODY; LAIMINS, 2010; CARTER; DING; ROSE, 2011; TAMAROZZI; GIULIATTI, 2018).

1.6 HPV e Cânceres Humanos

As infecções pelos papilomavírus são muito distintas e ocorrem na maior parte dos mamíferos e pássaros. Um grande número de papilomavírus tem sido encontrado nos humanos, que são os hospedeiros mais intensamente estudados (De VILLIERS, 2004). Atualmente, muitos agentes infecciosos têm sido identificados como fatores causais ou que contribuem para alguns tipos específicos de cânceres humanos (Zur HAUSEN, 2009). Cerca de 5% de todos os cânceres humanos, incluindo mais de 99% dos carcinomas cervicais, muitos carcinomas penianos, vulvares, vaginais e anais e crescente fração de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço são causados pelo HPVs de alto risco oncogênico (MUNGER; JONES, 2015; TAMAROZZI; GIULIATTI, 2018).

1.6.1 HPV e câncer de colo uterino

O papel do papilomavírus humano (HPV) na gênese do câncer de colo uterino ficou demonstrado a partir dos trabalhos de Durst *et al.* (1983) e Boshart *et al.* (1984), que isolaram pela primeira vez os HPVs 16 e 18 diretamente de material de biópsias de câncer da cérvix uterina e mostraram ser este vírus o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras deste tipo de câncer. A partir destas descobertas observou-se uma rápida expansão neste campo de pesquisas e o câncer de colo uterino tem sido o local onde o HPV é mais estudado (Zur HAUSEN, 2002). Atualmente, é fato reconhecido que praticamente todos os cânceres cervicais escamosos estão relacionados a infecções por HPVs de alto risco oncogênico. De acordo com Walboomers *et al.* (1999), a prevalência mundial do HPV no carcinoma de colo de útero chega aos 99,7%.

1.6.2 HPV e câncer vulvar

O câncer de vulva tem dois distintos tipos histopatológicos e conjuntos de fatores de risco. O câncer vulvar queratinizante que tem baixa prevalência de HPV (menos de 10%), ocorre na mulher idosa e está relacionado ao líquen plano. Por outro lado, o DNA do HPV pode ser encontrado em altas proporções (acima de 50%) nos cânceres basalóides e verrucosos da vulva que são vistos nas mulheres mais jovens e que estão associados aos clássicos fatores de risco para aquisição do HPV. Estes são frequentemente precedidos por neoplasia intraepitelial vulvar (NIV) ou *vulvar intraepithelial neoplasia* (VIN) e na maioria das vezes associados ao HPV16 (Zur HAUSEN, 1996; SCHIFFMAN; KJAER, 2003; IARC Monographs, 2007).

1.6.3 HPV e câncer vaginal

O número de casos analisados por exames de PCR nestes cânceres ainda é pequeno, porém a maioria deles foi positiva para o DNA do HPV. O tipo 16 foi o mais comum, tendo sido encontrado em cerca de 70% dos casos dos tumores examinados. Os HPVs 6 e 11 também foram encontrados assim como os tipos 18, 31, 33, 35 e 45 (CARTER *et al.*, 2001; DALING *et al.*; 2002).

1.6.4 HPV e câncer de pênis

Este tipo de câncer, similarmente ao câncer vulvar, pode apresentar duas etiologias: uma relacionada ao HPV e outra devido a fatores não relacionados à infecção por esse vírus. A grande maioria (95%) dos cânceres penianos é constituída de carcinoma de células escamosas que, por sua vez, são classificados em subtipos histológicos. A associação do câncer de pênis com a infecção pelo HPV pode ser diferente conforme o subtipo histológico do carcinoma de células escamosas. Dados mundiais indicam que os tipos de HPV 16 e 18 são os mais encontrados nos carcinomas escamosos penianos. Um tipo de HPV do grupo de baixo risco oncogênico, o HPV 6, embora menos frequentemente, também tem sido detectado no carcinoma de pênis. Contudo, a este achado, não se pode, necessariamente, atribuir a causa já que não é possível excluir a possibilidade de uma co-infecção com outro tipo de HPV de alto risco não estudado. A prevalência do HPV no câncer de pênis é estimada em 48% em todo o mundo (BACKES *et al.*, 2009).

1.6.5 HPV e câncer anal

Com relação ao câncer anal, as taxas de detecção do HPV variam de 70 a 100% conforme o gênero, localização, orientação sexual e positividade para o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana). Carter *et al.*, (2001) encontraram maior frequência do DNA do HPV em tumores anais femininos - 95,6%. Também nas mulheres encontraram a mais alta proporção do DNA do HPV 16 - 82,2%. A incidência deste tipo de câncer entre homens que fazem sexo com homens é similar àquela para o câncer de colo e é ainda mais elevada em homens infectados pelo HIV. Uma possível explicação para a relativamente alta incidência pode ser pela presença de zona de transformação no ânus a exemplo do que ocorre na cérvix uterina (STEENBERGEN *et al.*, 2005). De acordo com Carbone e De Paoli (2012), o HPV 16 é a mais importante causa do câncer anal.

1.6.6 HPV e câncer de células escamosas de cabeça e pescoço

Apesar de historicamente relacionados ao consumo de álcool e ao hábito de fumar, os cânceres de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) têm no HPV um fator de risco emergente. Estudo recente de revisão sistemática e meta análise demonstrou que a prevalência do HPV nos CCECP aumentou significativamente ao longo do tempo: de 40,5% antes do ano 2000 para 64,3% entre 2000 e 2004 e para 72,2% entre 2005 e 2009. Há evidências de que este tipo de câncer é uma doença multifatorial com, pelo menos, duas possíveis vias diferentes, uma conduzida pelo tabagismo e etilismo e a outra relacionada ao HPV (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007; MEHANNA *et al.*, 2013; PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

Os HPVs são a causa de uma forma, epidemiológica e clinicamente, distinta dos CCECP; sua presença nestes tumores evoca fatores de risco relacionados ao comportamento sexual, enquanto os carcinomas HPV negativos são fortemente relacionados ao uso do tabaco e do álcool (CHATURVEDI *et al.*, 2011). Atualmente, com muitos países vivenciando um declínio no uso do tabaco, o HPV pode se tornar o principal fator de risco para os CCECPs (GILLISON *et al.*, 2000; DOORBAR *et al.*, 2015; PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

Os primeiros indícios para um possível papel do HPV no CCECP foram propiciados pelo achado de antígenos virais em lesões pré-malignas da orofaringe (SYRJÄNEN *et al.*, 1983). Pouco tempo depois, surgiram os primeiros relatos

inequívocos de tipos específicos de HPV em carcinomas da língua e em outros carcinomas da orofaringe (LÖNING *et al.*, 1985; De VILLIERS *et al.*, 2005). Nos anos seguintes, numerosos estudos confirmaram estes dados, muito embora com taxa de positividade variando entre 25 a 60% (WEINBERGER *et al.*, 2006; PSYRRI; DiMAIO, 2008; GILLISON *et al.*, 2000). Uma estimativa mais conservadora de 25-30% de cânceres de orofaringe provavelmente causados por HPVs de alto risco pode estar mais próxima da realidade. Nos Estados Unidos, estatísticas mostraram, no período 1973 - 2001, um aumento da incidência anual de cânceres de base da língua e das tonsilas de 2,1 e 3,9% respectivamente. Práticas sexuais, como o contato oral-genital, parecem ser parcialmente responsáveis pela aquisição de infecções ano-genitais na cavidade oral (TRISTÃO *et al.*, 2012). Também é possível que estas infecções possam ser veiculadas por manipulações digitais de um sítio epitelial para outro. Em suma, aproximadamente, um quarto a um terço dos cânceres de orofaringe são causados por HPVs ano-genitais de alto risco. O status de infecção pelo HPV é atualmente um forte marcador prognóstico para pacientes com cânceres orofaríngeais (Zur HAUSEN, 1996; D'SOUZA *et al.*, 2009; Zur HAUSEN, 2009; SANO; ORIDATE, 2016).

1.7 HPV e Câncer de Mama

A associação entre o HPV e o câncer de mama foi proposta pela primeira vez em Roma, Itália, após ter sido demonstrada a presença de sequências de DNA do HPV16 em 29,4% dos carcinomas mamários analisados. A partir deste achado foi sugerido que este vírus pode estar implicado na gênese do carcinoma ductal mamário (Di LONARDO; VENUTI; MARCANTE, 1992).

Outros estudos têm demonstrado a presença de HPV de alto risco oncogênico, principalmente os tipos 16, 18 e 33, em amostras de câncer mamário em mulheres originárias das mais diversas etnias em todo o planeta: Noruega, China, Áustria, Brasil, Austrália, Turquia, Grécia, Síria, Japão, Iran, Índia e Reino Unido (HENNIG *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2000; WIDSCHWENDTER *et al.*, 2004; DAMIN *et al.*, 2004; KAN *et al.*, 2005; GUMUS *et al.*, 2006; KROUPIS *et al.*, 2006; AKIL *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2008; HENG *et al.*, 2009; ANTONSSON *et al.*, 2011; SIGAROODI *et al.*, 2012).

Os trabalhos continuaram em todo o mundo e estudos recentes registram a presença do HPV em percentuais relevantes de amostras de câncer mamário: no

Iraque, Ali *et al.* (2014) encontraram o DNA do HPV em 46,5% dos casos; na Itália, Piana *et al.* (2014) constataram a presença do DNA do HPV em 15% das amostras de câncer mamário; na China, Fu *et al.* (2015) e Yan *et al.* (2016) em 14,7% e 30,2%, respectivamente; no Paquistão, Ilahi *et al.* (2016) e Naushad *et al.* (2017) encontraram o DNA do HPV em 17,3% e 18,1%, respectivamente; no Reino Unido, Salman *et al.* (2017), em 47% das amostras de câncer de mama; na Índia, Islam *et al.* (2017), em 64%; na Espanha, Delgado-Garcia *et al.* (2017) em 51,8% dos casos; na Venezuela, Fernandes *et al.* (2015) e Ladera *et al.* (2017), em 41,7% e 63,6% dos casos, respectivamente, no Sudão, Elnoubi *et al.* (2017), detectaram o DNA do HPV em 67% dos casos e Habyarimana *et al.*, (2018) em Kigali, Ruanda, encontraram o DNA do HPV em 46,81% dos casos de cânceres de mama analisados.

O potencial mecanismo de transmissão do HPV permanece pouco esclarecido com opiniões divididas entre o espalhamento por contato direto do períneo para as mamas ou via sangue periférico com a ajuda das células mononucleadas constituindo, assim, via alternativa de transmissão do vírus para as mamas (BODAGHI *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2009; ANTONSSON *et al.*, 2011; SIMÕES *et al.*, 2012).

Nas infecções genitais a transmissão do HPV pode ser facilitada em superfícies epiteliais maceradas ou que sofreram abrasões e o vírus pode ser transferido digitalmente de um sítio epitelial para outro. Atitudes comportamentais como o sexo oral-genital podem levar a infecções da cavidade oral por HPV anogenital e a transmissão pela saliva pode desempenhar um papel relevante neste processo (Zur HAUSEN, 1996). Em acordo, pesquisa recente sugere que o aumento acentuado da incidência dos cânceres orofaríngeais pode estar relacionado a mudanças de comportamento sexual, tal como sexo oral com múltiplos parceiros desde idades precoces (SANO; ORIDATE, 2016).

De Villiers *et al.*, (2005) divulgaram trabalho realizado em 29 casos de mastectomia simples por carcinoma mamário; a seleção de casos tendo sido baseada na disponibilidade de tecidos tanto do mamilo como do tumor da mesma paciente. Estes autores, através de PCR, demonstraram a ocorrência do DNA do HPV em 17 (59%) dos pares de amostras. Tais resultados sugerem que o HPV pode infectar o epitélio do mamilo e da aréola, e, num mecanismo patogênico retrógrado,

se transferir para os ductos lactíferos e lóbulos, cabendo-lhes postular ser esta via padrão de disseminação do vírus. Kan *et al.*, (2005), analisando o estudo de De Villiers *et al.* (2005), especularam que as partículas virais do HPV podem ter sido transferidas do períneo para a região areolar e mamilar através das mãos da própria mulher durante a ducha ou banho.

A exposição dos ductos mamários para o ambiente externo aumenta o risco de infecção pelo HPV já que estas estruturas são condutos abertos e que, de fato, a maioria dos cânceres mamários é originada dos epitélios ductais (WANG *et al.*, 2012; SALMAN *et al.*, 2017). A alta prevalência da infecção pelo HPV na população sexualmente ativa representa um alto risco para a infecção do tecido mamário (WANG *et al.*, 2012).

Por outro lado, pesquisadores examinaram mulheres portadoras, ao mesmo tempo, de câncer de colo e de mama e procuraram investigar o tipo do HPV presente nas duas neoplasias de uma mesma paciente. Os resultados mostraram, em todos os casos, igual genótipo (HPV 16) em ambos os tumores e poderiam favorecer a hipótese de disseminação hematogênica e/ou linfática do DNA do HPV do colo uterino para as mamas (HENNIG *et al.*, 1999; DONG *et al.*, 2002; WIDSCHWENDTER *et al.*, 2004).

O estabelecimento de um papel oncogênico para o HPV em cânceres de mama conduz à possibilidade de prevenção primária de, pelo menos, alguns destes cânceres através de vacinação contra o HPV uma vez que estas preparações biológicas, já disponíveis contra o câncer de colo uterino, são consideradas eficazes contra os tipos 6, 11, 16 e 18 do HPV (RAMBOUT *et al.*, 2007; HENG *et al.*, 2009; RODRIGUES; ROCHAEL, 2012; JIN *et al.*, 2013). A disponibilidade e a aplicação generalizada destas vacinas podem inibir as infecções mamárias por estes mesmos tipos de HPV e resultar em uma diminuição do câncer de mama associado a este vírus. Desta forma, e através de monitoramento das mulheres vacinadas, em futuro próximo, será provavelmente possível a obtenção de maiores evidências quanto a um eventual papel causal do HPV no câncer de mama (LAWSON *et al.*, 2009; LAWSON, 2016a; SALMAN *et al.*, 2017).

2. OBJETIVOS

Geral

- Investigar a presença do DNA do HPV em tecidos de cânceres de mama por biologia molecular.

Específicos

- Verificar a presença do DNA do HPV em amostras de biópsias de cânceres mamários e em amostras de mamas normais pela reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Efetuar a tipagem do HPV em amostras de biópsias de cânceres de mama e em amostras de mamas normais.
- Analisar a distribuição de todos os resultados positivos para o DNA do HPV, por grupos etários.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo, do tipo caso-controle, foi realizado para avaliar a presença de infecção por HPV em tecidos de cânceres mamários (CM) e de mamas normais (MN). O cálculo amostral (N) foi baseado em uma relação caso-controle de 1:1. A taxa de exposição estimada foi de 50%, com um nível de confiança de 95% e um poder estatístico de 80%, OR (*Odds Ratio*) = 2. O “N” ficou definido em 106 indivíduos para cada grupo (JEKEL; ELMORE; KATZ, 2005). As amostras e os registros de prontuários foram selecionados nos bancos de dados através de fiéis depositários dos respectivos bancos, consecutivamente e retrospectivamente até o tamanho calculado do “N” ter sido atingido. Foram assim obtidas 212 amostras de mamas femininas, registradas no período de janeiro de 2010 a julho de 2015, dos arquivos da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e do Laboratório Biopse de Fortaleza, Ceará. Do total, 106 amostras eram de CM primários histologicamente comprovados, e 106 de amostras de MN originárias de mamoplastias estéticas redutoras, a serem utilizadas como controle normal de tecido mamário.

Os grupos etários definidos para a distribuição dos resultados baseiam-se em parâmetros reconhecidos e adotados em mastologia quanto ao início do rastreamento do CM na mulher, ou seja, a partir dos 40 anos (ACS, 2017) e em estudo sobre média de idade de menopausa no Brasil (51 anos) de acordo com Pedro *et al.*, (2003). Desta forma, neste estudo, as mulheres participantes constituíram subgrupos por faixas etárias: abaixo de 42 anos; 42 a 51 anos e acima de 51 anos.

Cada amostra de CM e de MN foi submetida previamente à amplificação do gene da β -globina humana como controle interno positivo para determinar a adequação do DNA extraído (SALMAN *et al.*, 2017).

3.1. Seleção dos casos

3.1.1. Critérios de inclusão

Para os CM: amostras de biópsia de câncer de mama.

Para as MN: amostras de produtos cirúrgicos de mamoplastias estéticas redutoras de mulheres sem história prévia de neoplasia mamária.

Para, ambos, CM e MN: amostras positivas para a reação com a β -globina.

3.1.2. Critérios de exclusão

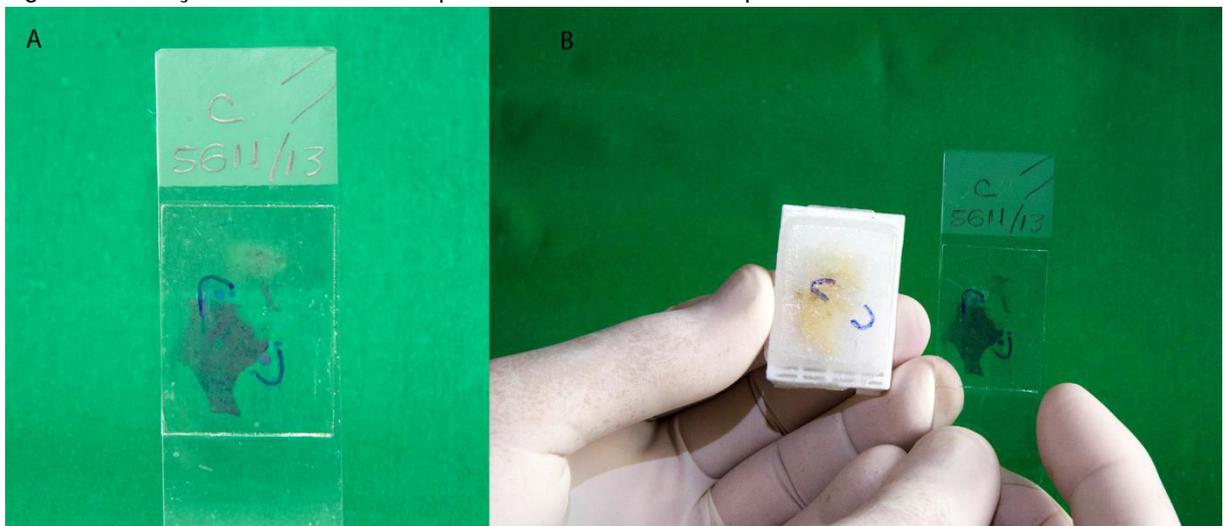
Para os CM: mulheres com história de terapia prévia por radiação ou citotóxica.

Para as MN: mulheres com história pregressa de neoplasia mamária.

Para ambos, CM e MN: amostras negativas para a reação com a β -globina.

Na etapa a seguir, as lâminas dos casos de CM selecionados foram revisadas pelo patologista e marcadas nos campos com tumor. O mesmo procedimento foi repetido para os controles de MN, a marcação das lâminas tendo sido feita nas áreas contendo dutos e lóbulos mamários. Depois, os blocos parafinizados correspondentes foram demarcados na área homóloga aos campos assinalados na lâmina (Figura 4).

Figura 4 - Seleção do material de arquivo de lâminas e blocos parafinizados

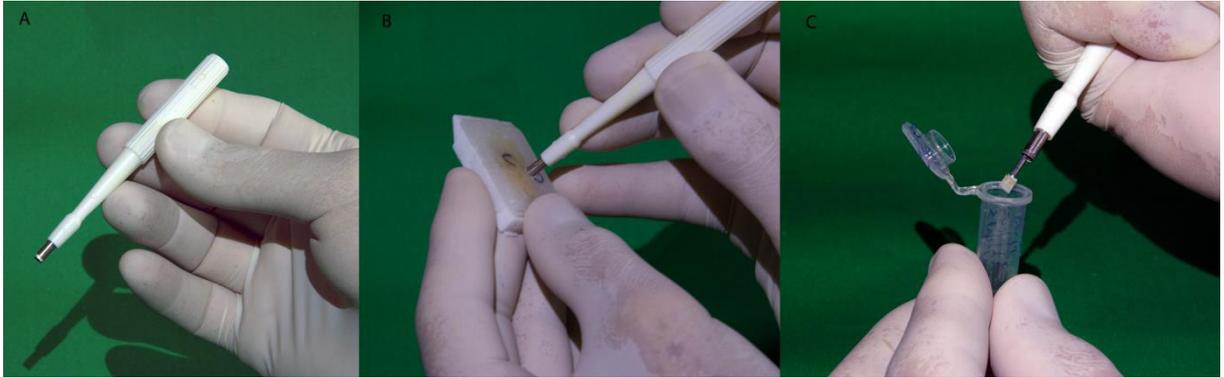


Fonte: Próprio autor (2016). Seleção da lâmina - amostra 62 de MN - e marcação do campo escolhido (A). Identificação do bloco parafinado correspondente e marcação do sítio de interesse (B).

Na sequência do experimento foi feito o corte dos blocos com biótomo (*punch*) descartável de dermatologia de 3 mm de diâmetro e os fragmentos obtidos

colocados em microtubos de 1,5 ml identificados e armazenados à -20°C até o processamento (Figura 5).

Figura 5 - Coleta do material de arquivo de lâminas e blocos parafinizados



Fonte: Próprio autor (2016). Biótomo (*punch*) de dermatologia (A). Corte do bloco parafinado (B). Deposição do fragmento em microtubo de 1,5 ml (C)

Todos os procedimentos de biologia molecular foram realizados pelo mesmo técnico empregando a mesma metodologia. Os riscos de contaminação e de resultados falso-positivos foram evitados com o uso sistemático e individual de lâmina de bisturi estéril para recortar e adequar cada fragmento de biópsia. Foram empregados materiais descartáveis e vidraria estéril durante todas as etapas. Durante todos os experimentos foram adotadas medidas para manter separações físicas das áreas para extração do DNA, preparo da PCR e análise dos fragmentos. Os fragmentos de biópsias e o DNA extraído foram cuidadosamente identificados e mantidos em caixas separadas.

3.1.3 Desparafinização

O procedimento foi realizado em acordo com a publicação de Nascimento *et al.* (2013), com algumas modificações. Os fragmentos parafinizados foram transferidos para tubos tipo Eppendorf de volume de 1,5 ml onde foram adicionados 0,5 ml de xilol. Em seguida a mistura foi incubada à temperatura de 55°C por 30 minutos e depois centrifugada a 13.000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos. Ao término da centrifugação o sobrenadante foi descartado e o procedimento de desparafinização foi repetido mais uma vez. Em seguida, a reidratação foi realizada pela adição de 1 ml de etanol a 100% v/v, sucedida por

centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos e novamente com descarte do sobrenadante. O procedimento de reidratação foi repetido mais duas vezes, sendo uma vez com 1 ml de etanol 90% v/v e a última vez com 1 ml de etanol 70% v/v. Em cada uma destas etapas, o material foi centrifugado a 13.000rpm por 5 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Ao final, o fragmento foi lavado com 1 ml de água ultrapura, e, na sequência, efetuada centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos e novamente desprezado o sobrenadante.

3.1.4 Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos desparafinizados foi realizada utilizando o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen – Thermo Fisher Scientific – Waltham, Massachusetts, USA)* seguindo as instruções do fabricante. Foi adicionado ao fragmento desparafinado 180 µl do *PureLink® Genomic Digestion Buffer* e 20 µl de Proteinase K, tendo o cuidado que todo o tecido ficasse imerso no tampão. Em seguida, a mistura foi incubada a 55 °C por 18 horas. O lisado foi centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente (TA). O sobrenadante, então, foi transferido para um novo microtubo e 20 µl de RNase A foi adicionado. Em etapa seguinte, foi realizada homogeneização por rápido vórtex e incubado a TA por 2 min. Em seguida, 200 µl de *Genomic Lysis/Binding Buffer* foram adicionados e realizada homogeneização, novamente por vórtex. Na sequência, foram adicionados ao lisado 200 µl de etanol 96-100% PA v/v e novamente executada homogeneização por vórtex por 5 segundos.

O lisado foi transferido para o tubo coluna (*PureLink® Spin Column*) previamente acoplado ao tubo coletor e depois centrifugado a 10.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente (TA). Em seguida, o filtrado foi descartado e o tubo coluna foi colocado a novo tubo coletor. Então, 500 µl de tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer 1*) foram adicionados à coluna para logo depois serem centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto a TA. O filtrado foi novamente descartado e a coluna contendo DNA foi colocada em novo tubo coletor. Depois, 500 µl do tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer 2*) foram adicionados e o conjunto centrifugado a 13.000 rpm por 3 minutos à TA. E novamente, o tubo coletor contendo o centrifugado foi descartado. O tubo coluna foi, então, colocado sobre um microtubo de 1,5 ml e o DNA foi solubilizado com 25 µl de *Genomic Elution Buffer*. Em seguida, a mistura contendo o DNA foi incubada por 1 minuto a TA. Para melhorar a eficiência da

solubilização, este procedimento foi repetido com 25 µl de *Genomic Elution Buffer*, porém com centrifugação por 1,5 minutos. O DNA solubilizado foi quantificado com Nanodrop 1000 Spectrophotometer, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA foram estocadas a -20 °C.

A qualidade do DNA extraído foi verificada através de PCR para beta-globina humana que constituiu o controle interno da amplificação. As amostras de todos os participantes foram validadas e consideradas apropriadas através de PCR com os iniciadores do gene da β-globina PC04 e GH20 (Tabela 1) capazes de gerar produto de 268 pb conforme protocolo descrito por Saiki *et al.* (1988).

3.1.5 Amplificação da região L1 do HPV

Para aumentar a sensibilidade da detecção para o HPV, a amplificação da região L1 foi realizada por PCR *nested*, como descrito em Sotlar *et al.*, (2004) com os iniciadores externos MY09/MY11 (Tabela 1) que amplificam um produto de 450 pb na região conservada do gene L1 e com os iniciadores internos GP5+/GP6+ (Tabela 1), para uma região consenso do gene L1, gerando um fragmento de 150 pb (KARLSEN *et al.*, 1996). Neste estudo esta PCR *nested* passa a ser denominada MY/GP.

Tabela 1 - Sequências dos iniciadores de consenso para MY09/MY11 e GP5+/GP6+ e para a β -globina

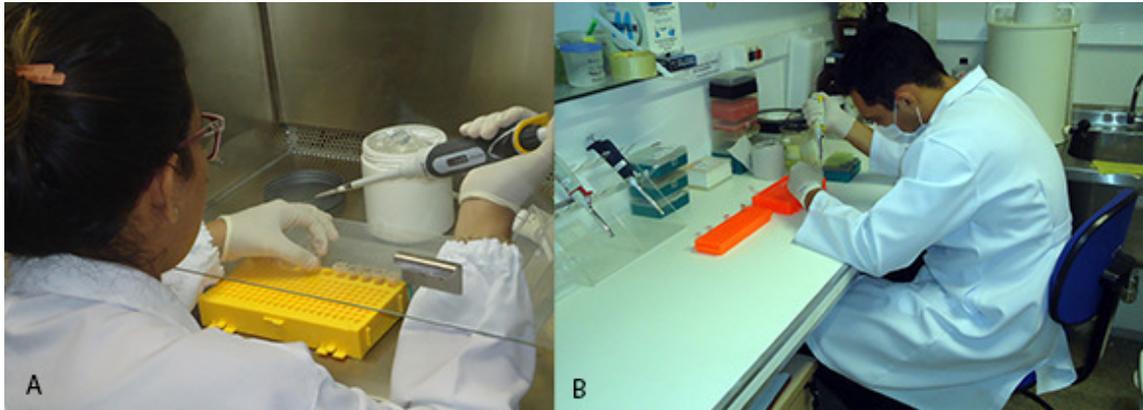
Iniciador	Sequências (5'-3')	Tamanho (pb)	Posição
MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	450	7015–7034
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG		6583–6602
GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	150	6624–6646
GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT AT TC		6724–6746
β -globina		268	
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC		
GH20	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC		

Fonte: Karlsen *et al.* (1996); Saiki *et al.* (1988).

Em cada reação foi empregado, como controle positivo de amplificação, DNA de HPV de amostra de condiloma vulvar positiva para o HPV e, como controle negativo, foi utilizada água ultrapura substituindo o DNA.

Para amplificação foi utilizado o kit PuReTaq Ready-To_Go PCR Beads (GE Healthcare - Little Chalfont - Buckinghamshire - Reino Unido) que contém a mistura para a PCR liofilizada em formato de microesferas (beads), predistribuída em microtubos de 0,25 mL tubes. Em cada microtubo foi adicionado 25 pM de cada iniciador (Life TechnologiesTM), 100 ng do DNA extraído e quantidade de H₂O suficiente para completar o volume de 25 μ l (Figura 6). As condições de amplificação com os iniciadores MY09/MY11 foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minutos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de extensão final a 72 °C por 14 minutos e manutenção da amplificação a 4 °C. A amplificação com os iniciadores para a β -globina foi realizada em micro tubo separado, porém nas mesmas condições que as empregadas para os iniciadores MY09/MY11. Todas as amplificações foram realizadas no termociclador Bioer GenePro (Hangzhou High Tech Industrial Development Zone - Binjiang District - China).

Figura 6 - Preparo da reação da polimerase em cadeia no laboratório de Micobactérias do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará



Fonte: próprio autor (2016). Preparo do mix de PCR com o kit PureTaq (A). Adição de DNA ao mix de PCR (B).

Para a reação com os iniciadores GP5+/GP6+, 2 μ L do produto da primeira PCR foram usados como amostra de DNA. Esta reação foi realizada nas mesmas condições de amplificação da reação com MY09/MY11, excetuando pelo anelamento a 40 °C por 2 minutos, extensão a 72 °C por 90 segundos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. As amplificações foram realizadas utilizando o mesmo termociclador Bioer (Bioer GenePro Hangzhou *High Tech Industrial Development Zone* - Binjiang District - China).

Os produtos das reações de amplificação foram visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose (*UltraPure Agarose* - Invitrogen®) 1,5% (p/v). A preparação dos géis de agarose ocorreu em tampão TBE 1x (0,09 M Tris-borato e 0,002 M EDTA) com adição de 3 μ l de brometo de etídio (Bio-Rad®) 10 mg/mL, à concentração final de 0,5 μ g/mL. Após a solidificação do gel, foi adicionado em cada poço a mistura contendo 10 μ l dos produtos da PCR e 3 μ l do tampão de carregamento *Blue/Orange LoadingDye* 6x (Promega®). Para comparação das bandas foram utilizados 5 μ l do marcador de peso molecular de 100pb (Promega®).

Os produtos de DNA foram visualizados e as imagens digitalizadas no transluminador de luz ultravioleta a 302 nm ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®). A eletroforese foi efetuada à voltagem constante de 5 V/cm linear por aproximadamente 75 minutos em fonte de eletroforese (*Electrophoresis Power Supply* – EPS, GE Healthcare®). As amostras de casos e controles negativas para a β -globina foram excluídas do estudo.

3.1.6 Tipagem do HPV por PCR - Multiplex *nested*

Todas as amostras β -globina DNA positivas foram submetidas à tipagem em reação tipo PCR *nested*, com iniciadores para região do gene E6-E7 do HPV, conforme publicação de Sotlar *et al.*, (2004). A primeira reação foi realizada com os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B para a região consenso E6-E7 do HPV tipo 16 GenBank No K02718.1 localizado entre os nucleotídeos 28 a 46 e de 636 a 658 e do HPV tipo 18 GenBank No X05015.1 entre os nucleotídeos 674 a 696 (Tabela 2). Foi utilizado o kit PuRe Taq Ready-To_Go PCR Beads (GE Healthcare - Little Chalfont - Buckinghamshire - Reino Unido), usando 100 ng do DNA extraído. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 40 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores de consenso para as regiões E6 e E7 do HPV

Consenso	Sequências (5' – 3')
GP-E6-3F	GGG WGK KAC TGA AAT CGG T
GP-E6-5B	CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA
GP-E6-6B	TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC

Fonte: Sotlar *et al.* (2004).

A reação subsequente de tipagem foi realizada em PCR multiplex em dois mix de iniciadores diferentes (Tabela 3), contendo iniciadores para HPV de baixo e alto risco oncogênico. O mix 1 contém iniciadores para os tipos 16, 18, 31, 45 e 59, enquanto que o mix 2 abrange os tipos 33, 6/11, 52, 56 e 58.

Para esta reação com os iniciadores tipo-específicos foi empregado o Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). As misturas das reações para um volume final de 25 μ l foram: 12,5 μ l de 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 2,5 μ l de 10x Mix dos iniciadores (2pMol cada), 2 μ l do Produto da 1ª reação, 8 μ l de H₂O para completar volume. As condições de amplificação foram: 95 °C por 15 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56 °C por 1,5 minutos, 72 °C por 45

segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos. Todas as amplificações da primeira e segunda reações foram realizadas no termociclador BIOER GenePro (Bioer).

Tabela 3 - Sequências de iniciadores para os 11 tipos específicos de HPV por PCR *nested*

Mix	HPV	Tamanho (pb)	Sequências (5' - 3')	Posição
I	16	457	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	141-161
			CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	597-573
	18	322	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	170-190
			GTT GTG AAA TCG TCG TTT TTC A	491-470
	31	263	GAA ATT GCA TGA ACT AAG CTC G	137-158
			CAC ATA TAC CTT TGT TTG TCA A	399-378
59	215	CAA AGG GGA ACT GCA AGA AAG	159-179	
		TAT AAC AGC GTA TCA GCA GC	373-354	
45	151	GTG GAA AAG TGC ATT ACA GG	82-101	
		ACC TCT GTG CGT TCC AAT GT	232-213	
II	33	398	ACT ATA CAC AAC ATT GAA CTA	172-192
			GTT TTT ACA CGT CAC AGT GCA	569-549
	6/11	334	TGC AAG AAT GCA CTG ACC AC	201-220
			TGC ATG TTG TCC AGC AGT GT	534-515
	58	274	GTA AAG TGT GCT TAC GAT TGC	297-317
			GTT GTT ACA GGT TAC ACT TGT	570-550
52	229	TAA GGC TGC AGT GTG TGC AG	178-197	
		CTA ATA GTT ATT TCA CTT AAT GGT	406-383	
56	181	GTG TGC AGA GTA TGT TTA TTG	294-394	
		TTT CTG TCA CAA TGC AAT TGC	475-455	

Fonte: Sotlar *et al.* (2004).

Depois da amplificação, os produtos foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1×, com adição de 3 µl de brometo de etídio (Bio-Rad®) 10 mg/mL, à concentração final de 0,5 µg/mL. Foi adicionado em cada poço a mistura contendo 10 µl dos produtos da PCR e 3 µl do tampão de carregamento Blue/Orange LoadingDye 6x (Promega®). Para comparação do tamanho dos produtos foi utilizado 5µl dos marcadores de peso molecular de 50 e 100 pb (Promega®, Wiscosin, Estados Unidos da América).

As imagens dos géis foram digitalizadas no transluminador de luz ultravioleta a 302 nm Image Quant 300 Capture (GE Healthcare®). A eletroforese foi efetuada à voltagem constante de 5 V/cm linear por aproximadamente 75 minutos em fonte de eletroforese (Electrophoresis Power Suply – EPS, GE Healthcare®).

3.1.7 Sequenciamento

O sequenciamento do produto amplificado da região E6/E7 foi efetuado empregando os mesmos iniciadores com o objetivo de confirmar a amplificação. Sendo a primeira reação de amplificação realizada com os iniciadores GP-E6-3F, GP-E6-5B e GP-E6-6B e a segunda reação com os iniciadores HPV-6/11 PR1 e HPV-6/11 PR2. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o Kit QIAquick PCR Purification antes do sequenciamento no equipamento ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), com a utilização dos kits Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) e Big DyeX Terminator Purification (Applied Biosystems®). As sequências foram analisadas com o software SeqScape v2.7 (Applied Biosystems) utilizando um ciclo de BigDye Terminator Kit de sequenciação. O BioEdit Sequence Alignment v. 7.2.5 Editor Copyright © 1997-2013 Tom Hall foi utilizado na realização de construção das sequências. Os resultados foram avaliados pelo BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (NCBI - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ferramenta que compara as sequências dos nucleotídeos encontrados, com base de dados e calcula a significância estatística da concordância. As sequências de referências HPV tipo 11 isolado 83A.11 (GenBank No KU298879.1) e HPV-16 E6/E7 gene de proteína de fusão (GenBank No FJ229356.1) foram usadas para alinhar as sequências (Figura 12).

3.1.8 Revisão Histopatológica dos casos selecionados

As preparações histológicas dos casos selecionados para este estudo foram analisadas pelo autor e por dois patologistas em microscópio Olympus BX41.

A classificação histológica e a graduação dos CM foram efetuadas em acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (AZZOPARDI *et al.*, 1982) e utilizando o sistema de Scarff-Bloom e Richardson (SBR) modificado por Elston e Ellis, (1991).

3.1.9 Laboratórios de suporte

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Micobactérias do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará de responsabilidade da Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota, em Fortaleza, Ceará e no Instituto Evandro Chagas, na cidade de Belém, no estado do Pará.

3.1.10 Análise estatística

O programa *GraphPad Prism 5* (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA*) foi utilizado para a análise das variáveis demográficas e da positividade do DNA de HPV. O teste exato de Fisher foi empregado para a análise de contingência e o valor de $p < 0,05$ foi definido como estatisticamente significativo.

3.1.11 Aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa com seres humanos

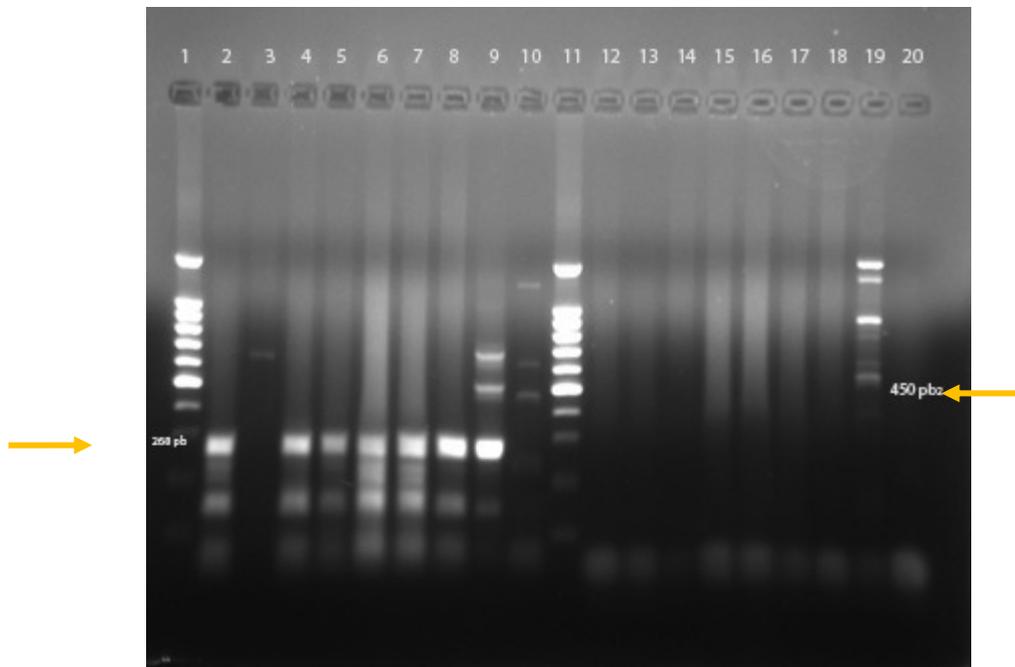
Este projeto foi submetido à Plataforma Brasil tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará - CEP/MEAC/UFC – pelo Parecer Consubstanciado de número 728.048 em reunião realizada em 25 de julho de 2014. Este documento e também os termos de Fiel Depositário para acesso aos arquivos da MEAC, do DPML e do Laboratório Biopse se encontram nos anexos A, B, C e D, respectivamente.

4. RESULTADOS

A faixa etária foi de 27 a 97 anos (média de $55,2 \pm 13,50$) para os CM e de 24 a 84 anos (média de $41,4 \pm 11,67$) para as MN.

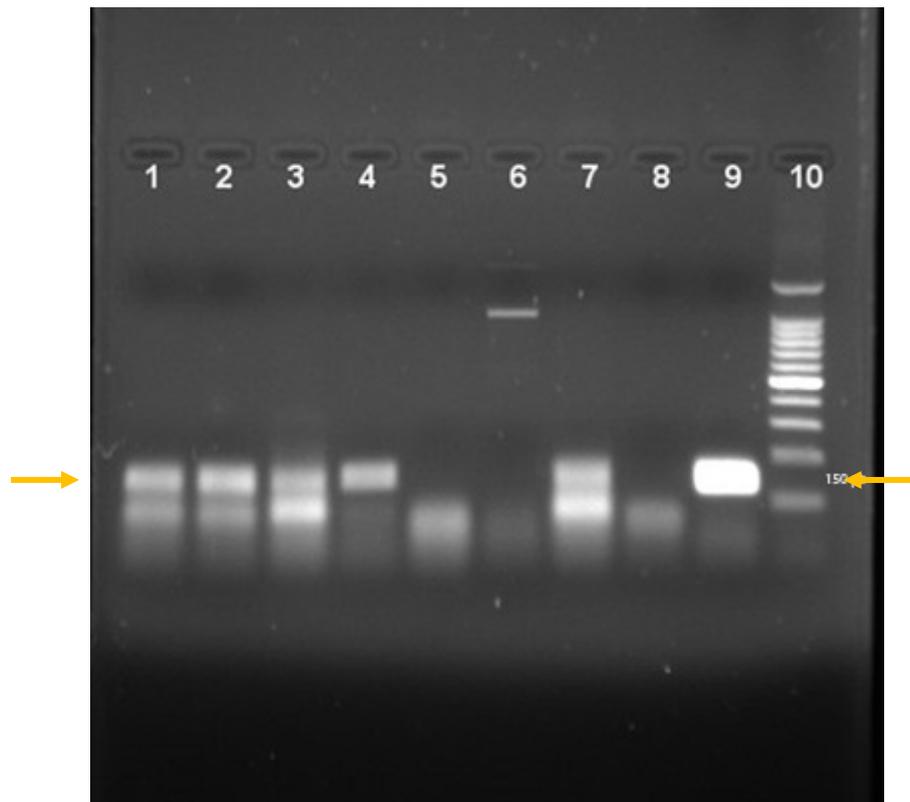
A amplificação do fragmento de 268 pb do gene da β -globina humana foi observada em 103/106 (97,2%) amostras dos CM e em 95/106 (89,6%) amostras das MN. Desta forma, o estudo final envolveu o total de 198 amostras.

Figura 7 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores MY09/MY11 e β -globina PC04 e GH20



Fonte: Próprio autor (2016). Gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região L1 do HPV e do controle interno do gene β -globina (268 pb). Poços 1 e 11: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega); poços 2 e 4 a 8: amostras positivas para β -globina exibindo produtos de 268 pb; poço 3: amostra negativa; poço 9: controle positivo (banda de 268 pb) com amostra de condiloma vulvar; poço 10: controle negativo (H_2O substituindo DNA); poços 12 a 18: amostras com ausência de produto de 450 pb com os iniciadores MY09/MY11; poço 19: controle positivo com amostra de condiloma vulvar com ausência de produto de 450 pb; e poço 20: controle negativo (H_2O substituindo DNA).

Figura 8 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores GP5+/GP6+

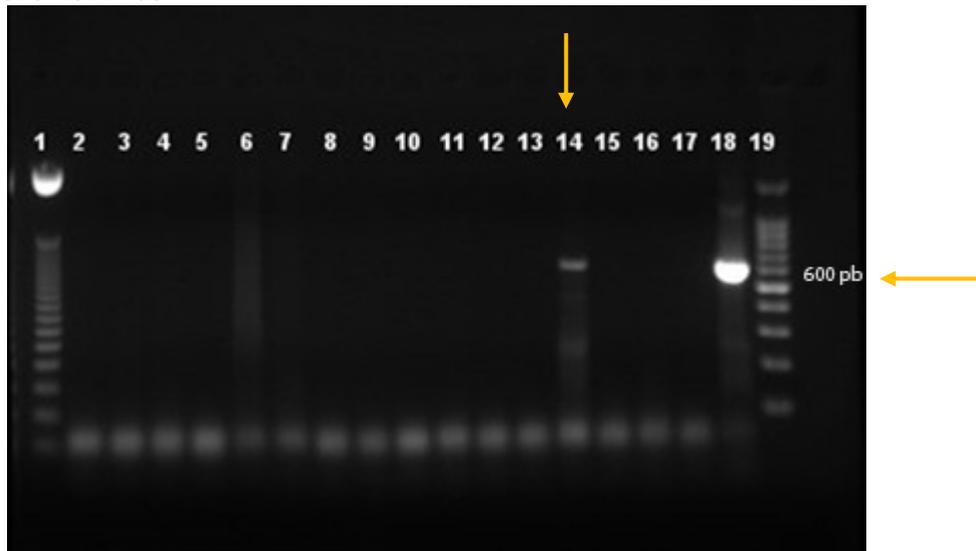


Fonte: Próprio autor (2016). Gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região L1 do HPV com os iniciadores GP5+/GP6+. Poços 1 a 4 e 7: amostras positivas para GP5+/GP6+ exibindo produtos de 150 pb; poço 5 e 6: amostras negativas; poço 8: controle negativo (H₂O substituindo DNA); poço 9: controle positivo (banda de 150 pb) com amostra de condiloma vulvar; e poço 10: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

A figura 7 mostra uma das fases iniciais do experimento com a amplificação da região L1 do HPV, ficando evidenciada a qualidade do DNA pela obtenção de amplificação do controle interno do gene β -globina (268 pb) para as amostras dos poços 2 e 4 a 8. Nos poços 12 a 18 não se observa amplificação para o produto de 450 pb com os iniciadores MY09/MY11.

Uma das etapas da PCR *nested* para a região L1 do HPV com amostras de CM com os iniciadores internos GP5+/GP6+ é mostrada na figura 8. Observa-se amplificação de produtos de 150 pb em cinco poços (1 a 4 e 7).

Figura 9 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B do gene E6-E7 do HPV

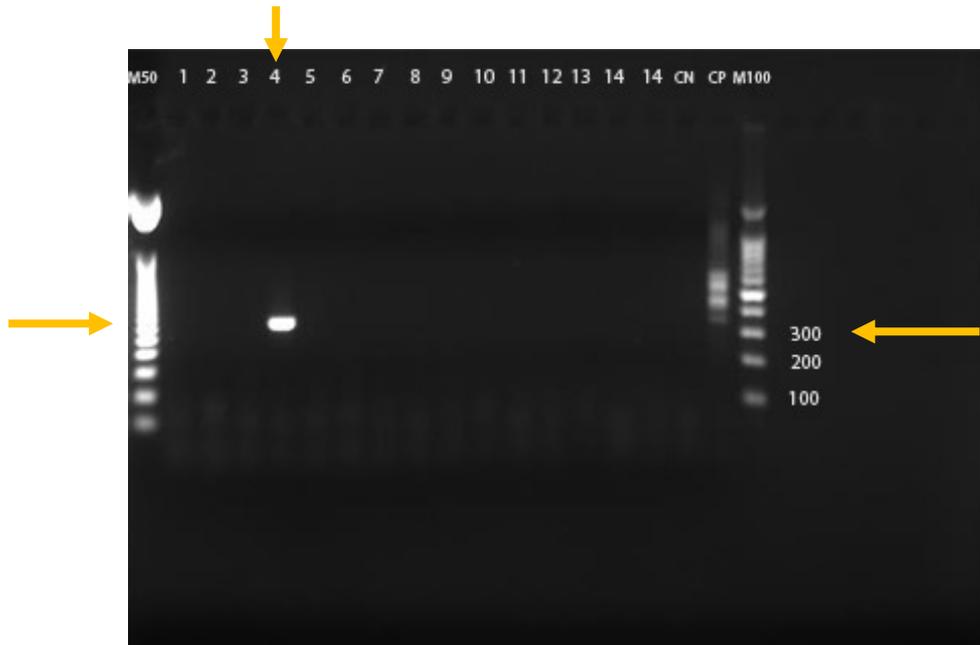


Fonte: Próprio autor (2016). Gel de agarose 2% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região E6-E7 do HPV com os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B (produto de 592 a 672 pb). Poço 1: Marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); poços 2 a 13 e 15 e 16: amostras com ausência de produto para os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B; poço 14: amostra positiva para GP-E6-3F/5B/6B exibindo produto de 600 pb; poço 17: controle negativo (H₂O substituindo DNA); poço 18: controle positivo (banda de 600 pb) com amostra de condiloma vulvar; e poço 19: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

A PCR *nested* das amostras de CM para a região de consenso do gene E6-E7 do HPV foi efetuada com iniciadores GP-E6-3F/5B/6B. A figura 9 mostra positividade para o DNA do HPV com a amplificação para produto de 600 pb no poço 14.

Um dos passos seguintes da PCR *nested* para amostras de CM, aqui já com os iniciadores tipo-específicos do Mix 2 para o gene E6-E7 do HPV (HPV tipos 33, 6/11, 58, 52 e 56), é exibido na figura 10. O poço 4 mostra amplificação de produto de 350 pb (HPV 6/11).

Figura 10 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores tipo-específicos Mix 2 (HPV tipos 33, 6/11, 58, 52 e 56) do gene E6-E7 do HPV

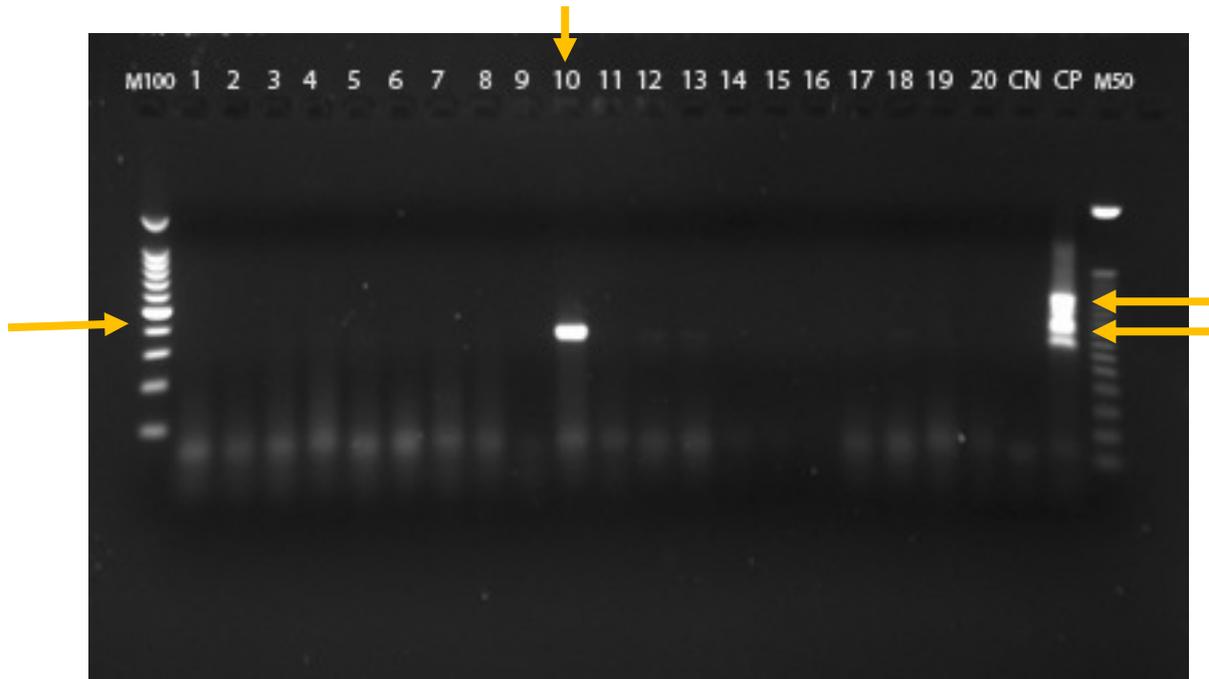


Fonte: Próprio autor (2016). Gel de agarose 2% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região E6-E7 do HPV com os iniciadores Mix 2, HPV 33 (398 pb), 6/11 (334 pb), 58 (274 pb), 52 (229 pb) e 56 (181 pb). M50: Marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); poços 1 a 2 e 5 a 14: amostras com ausência de produto para os iniciadores Mix 2; poço 4: amostra positiva para Mix 2 exibindo produto de 350 pb (HPV 6/11); CN: controle negativo (H₂O substituindo DNA); M100: controle positivo (bandas de 334 e 398 pb, HPVs 6/11 e 33) com amostra de condiloma vulvar; e M100: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega).

Dando sequência a PCR *nested* para amostras de CM com os iniciadores tipo-específicos do Mix 2 (HPV tipos 33, 6/11, 58, 52 e 56) do gene E6-E7 do HPV pode ser observada na figura 11 amplificação de produto de 398 pb (HPV 33) no poço 10.

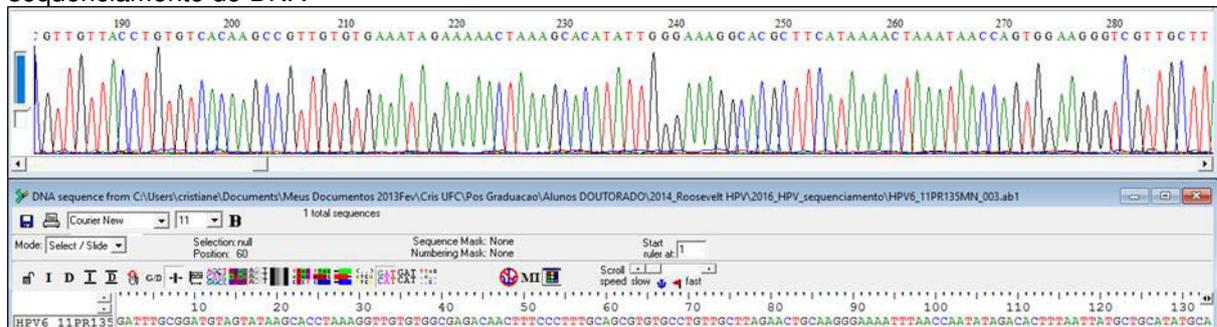
A qualidade do sequenciamento de uma das amostras positivas para o DNA do HPV é mostrada no eletroferograma da amostra 35 de MN (figura 12). Esta ferramenta revelou, nesta amostra, adequada qualidade do DNA com boa linha de base, picos distintos e bem definidos com regular distância entre eles.

Figura 11 - Amplificação de amostras de CM e de condiloma vulvar com os iniciadores tipo-específicos do Mix 2 (HPVs tipos 33, 6/11, 52, 56 e 58) para o gene E6-E7 do HPV



Fonte: Próprio autor (2016). Gel de agarose 2% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região E6-E7 do HPV com os iniciadores do Mix 2, HPV 33 (398 pb), HPV 6/11 (334 pb), HPV 58 (274 pb), HPV 52 (229 pb), HPV 56 (181 pb). Poço M50: Marcador de peso molecular de 50 pb (Promega); poço M100: Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega); poço 10: amostra positiva para Mix 2 exibindo produto de 398 pb (HPV 33); poços 2 a 9 e 11 a 20: amostras com ausência de produto para os iniciadores Mix 2; poço CN: controle negativo (H₂O substituindo DNA); poço CP: controle positivo (bandas de 334 e 398 pb (HPV 6/11 e HPV 33) com amostra de condiloma vulvar).

Figura 12 - Eletroferograma da amostra 35 de MN (HPV positiva) evidenciando a qualidade do sequenciamento do DNA



Fonte: Próprio autor (2016). O procedimento mostra boa linha de base, picos bem definidos e regular distância entre os picos (Programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* - *BioEdit*, Carlsbad, USA).

Tabela 4 – Todos os CMs do estudo distribuídos por tipo de tumor histológico e com os resultados positivos e negativos para o DNA do HPV com relação a cada tipo histológico

Tipo de Tumor Histológico	Total n=103 (%)	HPV positivo n=51 (%)	HPV negativo n=52 (%)
CDI	86 (83,5)	41 (80,4)	45 (86,5)
CDIS	9 (8,7)	4 (7,8)	5 (9,6)
CLI	6 (5,9)	4 (7,8)	2 (3,9)
N/D	2 (1,9)	2 (4)	0 (0)
TOTAL	103	51	52

Fonte: Próprio autor (2018). $P=0,4375$ (Teste de Fisher) na comparação dos CDI, HPV positivos e negativos com a soma dos demais tipos histológicos, HPV positivos e HPV negativos. CDI – Carcinoma ductal invasivo. CDIS – Carcinoma ductal *in situ*. CLI – Carcinoma lobular invasivo. N/D – não definido, refere-se a dois casos de CMs não classificados, no laudo, como ductal ou lobular.

Na distribuição do número total de CMs (N=103), por tipo de tumor histológico (Tabela 4) foram obtidos os resultados a seguir. Carcinoma ductal invasivo (CDI): 86/103 (83,5%) dos casos. Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): 9/103 (8,7%) dos casos. Carcinoma lobular invasivo (CLI): 6/103 (5,9%) dos casos. Não definido (ND) no laudo, quanto à origem ductal ou lobular: 2/103 (1,9%) dos casos.

As amostras dos CMs positivas para o DNA do HPV (N=51) e de acordo com cada tipo histológico (Tabela 4) ficaram distribuídas como descrito a seguir. Carcinoma ductal invasivo (CDI): 41/51 (80,4%) dos casos. Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): 4/51 (7,8%) dos casos. Carcinoma lobular invasivo (CLI): 4/51 (7,8%) dos casos. Não definido (ND), no laudo, quanto à origem ductal ou lobular: 2/51 (4%) dos casos.

As amostras dos CMs negativas para o DNA do HPV (N=52) e de acordo com cada tipo histológico (Tabela 4) ficaram assim distribuídas. Carcinoma ductal invasivo (CDI): 45/52 (86,5%) dos casos. Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): 5/52 (9,6%) dos casos. Carcinoma lobular invasivo (CLI): 2/52 (3,9%) dos casos.

Tabela 5 – Todos os CMs positivos e negativos para o DNA do HPV classificados histologicamente e por grau do sistema de graduação para o carcinoma de mama conforme Scarff-Bloom e Richardson (SBR) modificado por Elston e Ellis

SBR Graduação	HPV positivo n=51 (%)				HPV negativo n=52 (%)			Total 103
	Tipo de Tumor Histológico				Tipo de Tumor Histológico			
	CDI	CDIS	CLI	N/D	CDI	CDIS	CLI	
Grau I	12	n/a	2	2	9	n/a	1	26
Grau II	19	n/a	-	0	16	n/a	-	35
Grau III	10	n/a	1	0	16	n/a	-	27
N/I	0	-	1	0	4	-	1	6
N/A	-	4	-	-	-	5	-	9
Total	41 (80,4)	4 (7,8)	4 (7,8)	2 (4)	45 (86,5)	5 (9,6)	2 (3,9)	103

Fonte: Próprio autor (2018). Teste de Fisher, $p > 0,05$ (em todas as comparações). CDI – Carcinoma ductal invasivo. CDIS – Carcinoma ductal *in situ*. CLI – Carcinoma lobular invasivo. N/D - Não definido, refere-se a dois casos de CM não classificados, no laudo, como ductal ou lobular. N/A – não se aplica (graduação SBR não é aplicável aos CDIS). N/I – graduação de SBR não informada no laudo.

Os resultados de CMs positivos (51 casos) e negativos (52 casos) para o DNA do HPV foram distribuídos segundo o sistema de graduação para carcinoma de mama de Scarff-Bloom e Richardson (SBR) modificado por Elston e Ellis (Tabela 5). Do total, 21 (24,5%) casos eram grau I, em 35 (40,7%) casos foram classificados como grau II, em 26 (30,2%) casos eram grau III e em 4 (4,6%) casos o grau não foi informado. Os CDIS, para os quais este sistema não se aplica, eram 9 (8,7%) casos. Os carcinomas lobulares invasivos (CLI) totalizaram 6 (5,9%) casos e 2 (1,9%) casos (ND) não foram definidos no laudo, quanto á classificação e graduação. A comparação entre os resultados HPV positivos e HPV negativos para cada grau do sistema SBR não evidenciou diferença significativa.

A distribuição das amostras HPV positivas, segundo os diferentes conjuntos de iniciadores, é mostrada na Tabela 6. Na PCR com os iniciadores de consenso MY/GP foi observado que 43,7% (45/103) dos CM foram positivos para o DNA do HPV enquanto que somente 7,4% (07/95) das amostras de MN resultaram positivas para o DNA do HPV, $p < 0,0001$; OR = 9,754; 95 CI 4,116-23,11. Na PCR com os iniciadores E6-E7 10,7% (11/103) dos CM foram HPV positivos dos quais cinco já haviam sido detectados com os iniciadores MY/GP. Nesta mesma etapa

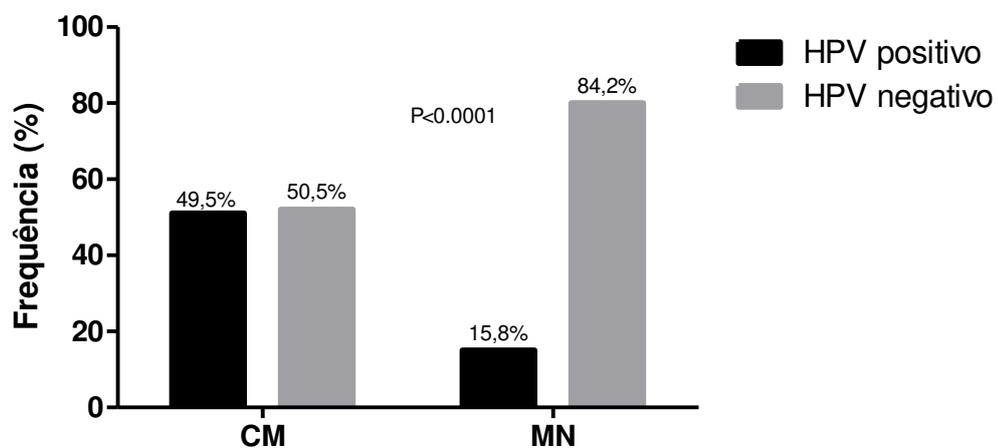
com E6-E7 verificou-se que 8,4% (8/95) das MN foram positivas para o DNA do HPV. Nenhuma destas amostras tendo sido positivas com os iniciadores MY/GP. Desta forma a positividade total para o DNA do HPV passou a ser de 49,5% (51/103) e 15,8% (15/95) nos CM e nas MN, respectivamente, $p < 0,0001$, Razão de chances (RC) = 5,231, 95% Intervalo de confiança (IC) 2,667-10,26.

Tabela 6 - PCR com os iniciadores MY/GP e E6-E7 e resultados positivos e negativos encontrados para o DNA do HPV nos CM e nas MN

Iniciadores	CM <i>n</i> =103 (%)	MN <i>n</i> =95 (%)	Valor de <i>p</i> ^a	RC ^b (95% IC ^c)
MY/GP				
Positivo	45 (43,7)	7 (7,4)	< 0,0001	9,75 (4,12-23,11)
Negativo	58 (56,3)	88 (92,6)		
E6-E7				
Positivo	11 [†] (10,7)	08 (8,4)		
Negativo	92 (89,3)	87 (91,6)		
MY/GP e E6-E7 [‡]				
Positivo	51 (49,5)	15 (15,8)	< 0,0001	5,23 (2,67-10,26)
Negativo	52 (50,5)	80 (84,2)		

Fonte: Próprio autor (2016). [†] Cinco dentre estes já haviam sido detectados com os iniciadores MY/GP; [‡] MY/GP e E6-E7 positivos mostra a soma dos resultados obtidos com cada um destes iniciadores; ^a Teste exato de Fisher; ^b RC: Razão de Chances; ^c IC: Intervalo de confiança.

Figura 13 – Representação dos resultados positivos e negativos do DNA do HPV em CM e MN



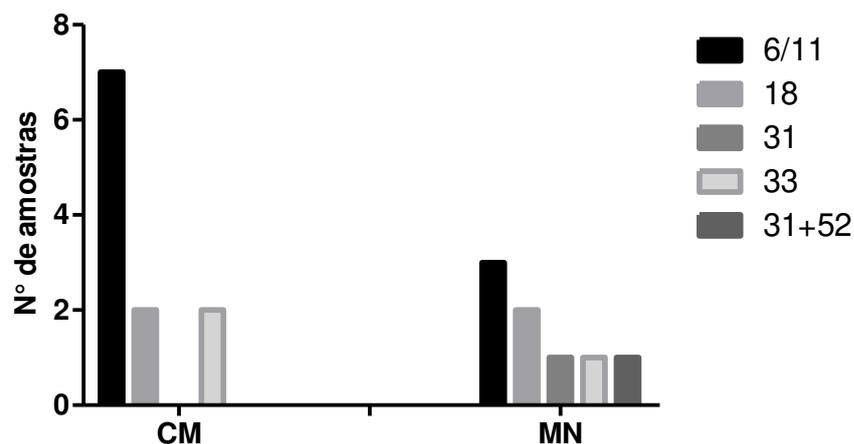
Fonte: Próprio autor (2016). Ilustração gráfica evidenciando as diferenças dos resultados positivos para o DNA do HPV na comparação de CM com MN ($p < 0,0001$).

Tabela 7 – Distribuição do HPV por genótipos e por grupo de risco para carcinogênese, nos resultados HPV positivos dos CM e das MN

Parâmetro	CM <i>n</i> =51 (%)	MN <i>n</i> =15 (%)	Valor de P	Total <i>n</i> =66 (%)
Genótipo				
6/11	7 (13,7)	3 (20)	0,5804	10 (15,2)
18	2 (3,9)	2 (13,3)		4 (6,1)
31	0	1 (6,7)		1 (1,5)
33	2 (3,9)	1 (6,7)		3 (4,5)
31 e 52	0	1 (6,7)		1 (1,5)
HPVX [†]	40 (78,5)	7 (46,6)		47 (71,2)
Grupo de risco				
Alto	4 (7,8)	5 (33,3)	0,3698	9 (13,6)
Baixo	7 (13,7)	3 (20)		10 (15,2)
HPVX [†]	40 (78,5)	7 (46,7)		47 (71,2)

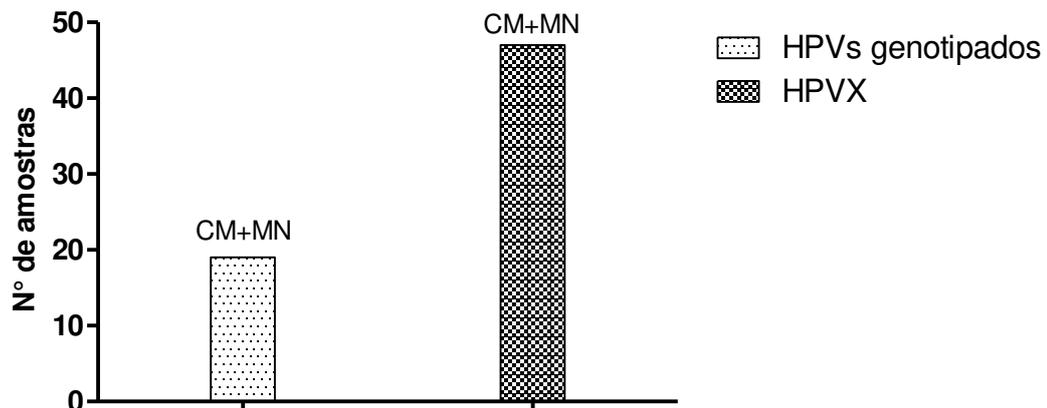
Fonte: Próprio autor (2016). [†] HPVX: tipos não especificamente detectados pelos iniciadores usados neste estudo.

Figura 14 - Representação da distribuição dos resultados positivos para o DNA do HPV nos CM e nas MN, segundo o genótipo



Fonte: Próprio autor (2018). Visualização gráfica da distribuição dos genótipos do HPV nos CM e nas MN evidenciando a maior prevalência dos HPVs 6/11.

Figura 15 – Todos os HPVs genotipados em CM e MN comparados à todos HPVX em CM e MN



Fonte: Próprio autor (2018). A ilustração evidencia menor número de HPVs genotipados e maior do HPVX, neste estudo.

Com relação à identificação dos genótipos (Tabela 7) os HPV 6/11 foram os mais comuns (15,2%; 10/66). Sete (13,7%) amostras de CM e três (20%) de MN foram positivas para o HPV 6/11 (Figura 14), seguidos por duas (3,9%) amostras de CM e duas (13,3%) de MN que foram positivas para o HPV 18. Adicionalmente, uma (6,7%) amostra de MN e outra positiva para o HPV 52 (6,7%) foram positivas para o HPV 31. O HPV 33 foi identificado em duas (3,9%) amostras de CM e em uma (6,7%) de MN. Os HPVs cujos genótipos não foram identificados (HPVX) corresponderam a 78,5% (40/51) das amostras de CM e em 46,6% (7/15) das amostras de MN (Figura 15). Com relação a amostras positivas para HPVs de alto risco oncogênico, 7,8% (4/51) estavam no grupo de CM e 33,3% no grupo de MN. Além disso, entre as amostras positivas para HPV de baixo risco oncogênico, 13,7% (7/51) estavam no grupo de CM e 20% (3/15) no grupo de MN.

Os resultados positivos para DNA do HPV dos CM e MN foram distribuídos por três faixas etárias (Tabela 8). O DNA do HPV foi identificado em 77,8 (14/18) dos CM e em 15% (8/53) das MN entre as participantes com idade abaixo de 42 anos ($p < 0,0001$). Nas participantes com 42-51 anos, o DNA do HPV foi identificado em 52,2% (12/23) dos CM e em 16% (4/25) das MN ($p = 0.0135$). Entre as participantes com idade acima de 51 anos o DNA do HPV foi identificado em 40,3% (25/62) dos CM e em 17,6 (3/17) das MN ($p = 0,956$). No grupo dos CM, a infecção pelo HPV foi mais comum entre as mulheres abaixo de 42 anos do que

naquelas com idade acima de 51 anos ($p = 0,0070$). Contudo, nenhuma diferença significativa foi observada com relação ao status da infecção pelo HPV e as diferentes idades do grupo MN.

Tabela 8 – Todas as ocorrências HPV positivas nos CM e nas MN distribuídas de acordo com a faixa etária

Faixa etária (anos)	Câncer de mama (CM)			Mama normal (MN)			p ^g
	HPV positivo n=51 (%)	HPV negativo n=52 (%)	Total n=103 (%)	HPV positivo n=15 (%)	HPV negativo n=80 (%)	Total n=95 (%)	
< 42	14 (77,8) ^c	4 (22,2)	18 (100)	8 (15) ^f	45 (85)	53 (100)	<0,0001
p	0,1138 ^a			p=1,0000 ^d			
42-51	12 (52,2)	11 (47,8)	23 (100)	4 (16)	21 (84)	25 (100)	0,0135
p	0,3387 ^b			p=1,0000 ^e			
> 51	25 (40,3) ^c	37 (59,7)	62 (100)	3 (17,6) ^f	14 (82,4)	17 (100)	0,0956

Fonte: Próprio autor (2016). ^aComparação de <42 e 42-51 anos no grupo CM; ^bComparação de 42-51 e >51 anos no grupo CM; ^cComparação de <42 e > 51 anos no grupo CM, $p=0,0070$; ^dComparação de <42 e 42-51 anos no grupo MN; ^eComparação de 42-51 e >51 anos no grupo MN; ^fComparação de <42 e >51 no grupo MN, $p= 1,0000$; ^gComparação de HPV positivo e HPV negativo. Todas as comparações realizadas com o Teste exato de Fisher.

Confirmação dos ácidos nucleicos de HPV por sequenciamento

Os produtos de DNA das amostras de HPV do controle positivo de condiloma vulvar e da amostra 35 de MN (HPV positiva) foram submetidos ao sequenciamento, tendo sido confirmada a amplificação da região E6-E7 do HPV. A primeira reação desta amplificação com os iniciadores GP-E6-3F, GP-E6-5B e GP-E6-6B e a segunda reação com os iniciadores HPV-6/11 PR1 e HPV-6/11 PR2.

Em seguida foi utilizada a ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) da região sequenciada do gene E6-E7 de HPV das mesmas amostras acima relacionadas, onde foi alinhada com a referência do HPV tipo 11 isolado 83A.11 (GenBank No KU298879.1) e do HPV-16 E6/E7 gene de proteína de fusão (GenBank No FJ229356.1) no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) onde foi observada 100% de identidade do fragmento

analisado com relação à base de dados das sequências de referência (Figuras 16 a 19).

Figura 16 – Pesquisa de alinhamento da sequência da amostra 35 de MN (HPV positiva) no NCBI

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 isolate 83A.11, complete genome	14633	14633	100%	0.0	100%	KU298879.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate LP16	14617	14617	100%	0.0	99%	HE611268.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate LP12	14617	14617	100%	0.0	99%	FN907957.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 isolate GUMC-AJ-Lung, complete genome	14611	19190	100%	0.0	99%	JN644142.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 isolate GUMC-AJ, complete genome	14611	14611	100%	0.0	99%	JN644141.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate LP2	14611	14611	100%	0.0	99%	HE611271.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate LP19	14611	14611	100%	0.0	99%	HE611259.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate A48	14611	14611	100%	0.0	99%	FN907961.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate CAC246	14611	14611	100%	0.0	99%	FN907960.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate A47	14611	14611	100%	0.0	99%	FN907959.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate LP20	14606	14606	100%	0.0	99%	HE611269.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate JO-RRP_3	14606	14606	100%	0.0	99%	HE574703.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate LP126	14600	14600	100%	0.0	99%	HE611264.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate JO-RRP_1	14600	14600	100%	0.0	99%	HE574701.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate JO-RRP_5	14595	14595	100%	0.0	99%	HE574705.1
<input type="checkbox"/>	Human papillomavirus type 11 complete genome, isolate JO-RRP_2	14595	14595	100%	0.0	99%	HE574702.1

Fonte: Próprio autor (2016). Comparação da sequência do produto amplificado da amostra 35 de MN (HPV positiva) com a referência do HPV tipo 11 isolado 83A.11 (GenBank No KU298879.1) no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e mostrando 100% de identidade do fragmento analisado com relação à base de dados das sequências de referência. NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Figura 17 – Pesquisa de alinhamento da sequência do controle positivo de HPV do condiloma vulvar no NCBI

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Synthetic construct HPV-16 E6/E7 fusion protein gene, complete cds	1511	1511	100%	0.0	100%	FJ229356.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct CRTHE6E7m (CRTHE6E7m) gene, complete cds	769	769	91%	0.0	85%	KP898250.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct modified E7 oncogene protein gene, complete cds	501	501	35%	1e-137	98%	EU443245.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct E6 oncogene protein gene, complete cds	436	436	48%	4e-118	86%	AF373108.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct clone mc55E7 s-E7 gene, complete cds	412	412	35%	7e-111	92%	JF304421.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct E7 oncogene protein gene, complete cds	363	363	35%	7e-96	89%	AF373107.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Hepatitis B surface antigen/human papillomavirus EE7-FLAG hybrid protein (HBsAg	361	361	35%	3e-95	89%	AY599017.1
<input type="checkbox"/> Synthetic construct Hepatitis B surface antigen/human papillomavirus EE7 (D1-35) hybrid protein (HBsA	255	255	23%	1e-63	90%	AY599018.1

Fonte: Próprio autor (2016). Comparação da sequência do produto amplificado da amostra de condiloma vulvar com a referência do HPV-16 E6/E7 gene de proteína de fusão (GenBank No FJ229356.1) no National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e mostrando 100% de identidade do fragmento analisado com relação à base de dados das sequências de referência. NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Figura 18 - Alinhamento do sequenciamento da região E6-E7 do HPV da amostra 35 de MN (HPV positiva) com a referência HPV tipo 11 isolado 83A.11 (GenBank Nº KU298879.1) no NCBI

[Download](#) [Graphics](#)

HPV6_11PR135MN

Sequence ID: Query_212297 Length: 310 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 310 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

NW Score	Identities	Gaps	Strand
620	310/310(100%)	0/310(0%)	Plus/Plus
Query 1	GATTTGCGGATGTAGTATAAGCACCTAAAGGTTGTGTGGCGAGACAACCTTTCCCTTTGCA		60
Sbjct 1	GATTTGCGGATGTAGTATAAGCACCTAAAGGTTGTGTGGCGAGACAACCTTTCCCTTTGCA		60
Query 61	GCGTGTGCCTGTTGCTTAGAACTGCAAGGGAAAAATTTAACCAATATAGACACTTTAATTA		120
Sbjct 61	GCGTGTGCCTGTTGCTTAGAACTGCAAGGGAAAAATTTAACCAATATAGACACTTTAATTA		120
Query 121	TGCTGCATATGCACCTACAGTAGAAGAAGAACTAATGAAGATATTTAAAAGTGTAAAT		180
Sbjct 121	TGCTGCATATGCACCTACAGTAGAAGAAGAACTAATGAAGATATTTAAAAGTGTAAAT		180
Query 181	TCGTTGTTACCTGTGTCAACAAGCCGTTGTGTGAAATAGAAAACTAAAGCACATATTGGG		240
Sbjct 181	TCGTTGTTACCTGTGTCAACAAGCCGTTGTGTGAAATAGAAAACTAAAGCACATATTGGG		240
Query 241	AAAGGCACGCTTCATAAACTAAATAACCAAGTGGAAAGGTCGTTGCTTACACTGTAATTG		300
Sbjct 241	AAAGGCACGCTTCATAAACTAAATAACCAAGTGGAAAGGTCGTTGCTTACACTGTAATTG		300
Query 301	AAATGGAAAT 310		
Sbjct 301	AAATGGAAAT 310		

Fonte: Próprio autor (2016). A primeira sequência nucleotídica refere-se à réplica da amostra 35, enquanto que a sequência inferior representa a sequência referência HPV tipo 11 isolado 83A.11. NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Figura 19 - Alinhamento do sequenciamento da região E6-E7 do HPV da amostra do controle positivo de condiloma vulvar com a referência HPV-16 E6/E7 gene da proteína de fusão (GenBank N° FJ229356.1) no NCBI

Synthetic construct HPV-16 E6/E7 fusion protein gene, complete cds					
Sequence ID: FJ229356.1 Length: 818 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 818 GenBank Graphics					▼ Next Match ▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1511 bits(818)	0.0	818/818(100%)	0/818(0%)	Plus/Plus	
Query 1	GAATTCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGCCACACGGGTG				60
Sbjct 1	GAATTCGCCACCATGGACTGGACCTGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGCCACACGGGTG				60
Query 61	CACAGCTTCCAGGACCCCCAGGAGAGCGGCAGAAAGCTGCCTCAGCTGTGTACCGAGCTG				120
Sbjct 61	CACAGCTTCCAGGACCCCCAGGAGAGCGGCAGAAAGCTGCCTCAGCTGTGTACCGAGCTG				120
Query 121	CAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAGTGTGTGTAAGCAGCAGCTGCTGAGG				180
Sbjct 121	CAGACCACCATCCACGACATCATCCTGGAGTGTGTGTAAGCAGCAGCTGCTGAGG				180
Query 181	AGAGAGGTGTACGACCGGGACCTGTGTATCGTGTACAGGGACGGCAATCCCTACGCCGTG				240
Sbjct 181	AGAGAGGTGTACGACCGGGACCTGTGTATCGTGTACAGGGACGGCAATCCCTACGCCGTG				240
Query 241	TGTGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGC				300
Sbjct 241	TGTGACAAGTGCCTGAAGTTCTACAGCAAGATCAGCGAGTACCGGCACTACTGCTACAGC				300
Query 301	CTGTACGGCACCACCTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCCCCTGTGTGACCTGCTGATCCGG				360
Sbjct 301	CTGTACGGCACCACCTGGAGCAGCAGTACAACAAGCCCCCTGTGTGACCTGCTGATCCGG				360
Query 361	TGTATCAACTGCCAGAAGCCCCCTGCAGAGACACCTGGACAAGAAGCAGCGGTTCCACAAC				420
Sbjct 361	TGTATCAACTGCCAGAAGCCCCCTGCAGAGACACCTGGACAAGAAGCAGCGGTTCCACAAC				420
Query 421	ATCAGGGGCAGATGGACCGGCAGATGTATGAGCTGCTGCCGGAGCAGCAGAACCAGAAGG				480
Sbjct 421	ATCAGGGGCAGATGGACCGGCAGATGTATGAGCTGCTGCCGGAGCAGCAGAACCAGAAGG				480
Query 481	GAGACCCAGCTGAGAGGCCGGAAGAGAAGAAGCCACGGCGATACCCCCACCTGCACGAG				540
Sbjct 481	GAGACCCAGCTGAGAGGCCGGAAGAGAAGAAGCCACGGCGATACCCCCACCTGCACGAG				540
Query 541	TACATGCTGGACCTGCAGCCTGAGACCACCGATCTGTACGGCTACGGCCAGCTGAATGAC				600
Sbjct 541	TACATGCTGGACCTGCAGCCTGAGACCACCGATCTGTACGGCTACGGCCAGCTGAATGAC				600

Fonte: Próprio autor (2016). A primeira sequência nucleotídica se refere ao DNA do controle positivo, enquanto que a linha inferior representa a sequência referência HPV-16 E6/E7 gene da proteína de fusão. NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

5. DISCUSSÃO

Este estudo encontrou uma elevada positividade para o HPV na PCR das amostras de CM. O DNA do HPV foi detectado em 49,5% dos casos de CM e em 15,8% dos controles de MN indicando uma diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos. Estes resultados dão suporte a uma potencial relação entre a infecção pelo HPV e o câncer de mama. A razão de chances (*Odds Ratio*) para a positividade do HPV foi 5,2 vezes maior nos casos de CM do que nas amostras dos controles de MN. Os resultados deste trabalho são muito semelhantes aos de estudo realizado em Alicante, Espanha, também utilizando amostras parafinizadas de cânceres mamários (DELGADO-GARCIA *et al.*, 2017) e que encontrou uma proporção de positividade para o HPV de 51,8% e 26,3% para os casos e controles respectivamente. Por outro lado, neste estudo, os resultados foram muito mais expressivos do que aqueles descritos em estudo de meta-análise compreendendo 29 pesquisas (SIMÕES *et al.*, 2012) nas quais a prevalência da infecção pelo HPV foi de 23% nos CM e de 12,9% nos controles de MN. Este é o primeiro estudo conduzido no Nordeste do Brasil para investigar a associação entre a infecção pelo HPV e o câncer de mama e que obteve resultados significantes de positividade para este vírus. Até agora, poucos trabalhos com este mesmo objetivo foram realizados na América do Sul, um tendo sido no Brasil (DAMIN *et al.*, 2004), outro na Argentina (PEREIRA-SUAREZ *et al.*, 2013) e dois na Venezuela (FERNANDES *et al.*, 2015 ; LADERA *et al.*, 2017).

Neste trabalho foram utilizados dois conjuntos de iniciadores de consenso e onze iniciadores para tipos específicos e identificados os HPVs 6/11 como os mais frequentes (15,2%) na população estudada. Da mesma forma, estudo conduzido em Heideberg, Alemanha, com amostras de câncer mamário oriundas da cidade de Longview, Washington, Estados Unidos da América (De VILLIERS *et al.*, 2005), identificou os tipos 6 e 11 como os mais frequentes. Li *et al.* (2011), em meta-análise sobre a infecção pelo HPV e o risco para o carcinoma mamário e comentando sobre os registros de achados dos HPVs 6 e 11 em câncer mamário, consideraram que a oncogenicidade do HPV poderia ser diferente da cérvix uterina para a mama. De fato, outras pesquisas parecem dar suporte a esta hipótese. Recentemente, nas cidades iranianas de Isfahan (MANZOURI *et al.*, 2014), Tabriz (AHANGAR-OSKOUE *et al.*, 2014) e Mashhad (SALEHPOUR *et al.*, 2015), em estudos distintos realizados

em amostras de cânceres mamários, também foram identificados os genótipos 6 e 11 como os mais frequentes. Estes genótipos são classificados como de baixo risco oncogênico para o trato genital inferior e, geralmente, associados com verrugas vulvares benignas, também conhecidas como condilomas (GROVES; COLEMAN, 2015; TAMAROZZI; GIULIATTI, 2018). Não obstante, outros estudos têm reportado a presença de HPVs de alto risco oncogênico nas amostras dos cânceres mamários examinados (Di LONARDO; VENUTI; MARCANTE, 1992; DAMIN *et al.*, 2004; AKIL *et al.*, 2008; ANTONSSON *et al.*, 2011; DELGADO-GARCIA *et al.*, 2017; ISLAM *et al.*, 2017; HABYARIMANA *et al.*, 2018).

Uma pesquisa realizada na última década do século passado já havia antecipado a possibilidade de um papel para o HPV de baixo risco na oncogênese mamária (BAND *et al.*, 1993). Estes pesquisadores, após terem efetuado a transfecção do HPV 6 para células mamárias normais, demonstraram que o gene E6 do HPV 6 (e não somente o gene E6 do HPV-16) pode também imortalizar estas células. De fato, outros trabalhos demonstraram a presença do HPV de baixo risco tipo 6 em tumores da vulva e do ânus e também em carcinomas de células escamosas brônquicos (RANDO *et al.*, 1986; KASHER; ROMAN, 1988; SYRJÄNEN *et al.*, 1989). No entanto, Backes *et al.* (2009), após analisarem a presença do HPV6 em casos de câncer de pênis, ponderam que este achado não implica necessariamente em causa já que não se pode excluir a possibilidade de que outro HPV de alto risco esteja presente, em co-infecção, nestes casos positivos pra o HPV6. Estes autores concluem explicando que os estudos frequentemente não realizam genotipagem para todos os HPV de alto risco.

De forma notável, o HPV de alto risco do tipo 16 não foi detectado neste estudo diferentemente de outras pesquisas que têm encontrado a prevalência deste genótipo nas amostras de CM estudadas. Estudo de meta-análise sobre a infecção pelo HPV e o risco de câncer mamário e examinando os resultados distribuídos por tipos de HPV, concluíram ser o HPV 16 o mais prevalente entre os trabalhos analisados (BAE; KIM, 2016). De fato, no Sul do Brasil (DAMIN *et al.*, 2004), em pesquisa realizada com amostras de cânceres mamários, utilizando iniciadores (*primers*) para dois tipos de HPV, a saber, 16 e 18, encontrou predominância do tipo 16. Mais recentemente, outros estudos também encontraram esta prevalência (DELGADO-GARCIA *et al.*, 2017 ; ISLAM *et al.*, 2017; HABYARIMANA *et al.*, 2018).

Parece existir uma ampla gama de distribuição de genótipos de HPV em amostras de câncer de mama, dependendo da região geográfica (WANG *et al.*, 2012). Em acordo com esta observação, estudos realizados na China (YU *et al.*, 2000) e Síria (AKIL *et al.*, 2008) identificaram o HPV 33 como o mais frequente nas amostras de câncer mamário. Da mesma forma, em Montreal, Canadá, estudo identificou o HPV 16 em todas as amostras de câncer de mama (YASMEEN *et al.*, 2007). Por outro lado, dois outros estudos conduzidos na Austrália com amostras de câncer de mama, um em Sidney (KAN *et al.*, 2005) e outro em Queensland (ANTONSSON *et al.*, 2011) encontraram o HPV 18 em 48% e 50% das amostras, respectivamente, mas nenhuma detecção para o HPV 16, enquanto pesquisa efetuada no Reino Unido (SALMAN *et al.* 2017), encontrou predominância do HPV do tipo 39 em seus espécimes de câncer de mama. Lawson *et al.* (2006), já haviam observado que os genótipos do HPV poderiam variar em função de distintas áreas geográficas e, ao mesmo tempo, com oncogenicidade diferente.

Considerando as dimensões de um país continental como o Brasil, é possível explicar a diversidade baseada na distribuição geográfica deste vírus. Contudo, o único estudo prévio no Brasil (DAMIN *et al.*, 2004), com detecção do HPV em amostras de câncer mamário, usou conjuntos de iniciadores (*primers*) específicos para os HPVs 16 e 18 o que, em princípio, tornaria difícil a detecção de outros genótipos (De VILLIERS, 2005). Sobre este aspecto, pode-se acrescentar que a introdução de novas tecnologias moleculares tem possibilitado a descoberta de novos tipos de HPV, sendo atualmente estimada a existência de pelo menos 400 diferentes tipos destes vírus (BZHALAVA; EKLUND; DILNER, 2015). Assim, ensaios utilizando iniciadores tipo-específicos têm limitações que devem ser consideradas, na medida em estas experiências podem não revelar todos os genótipos, eventualmente, presentes na amostra (SALMAN *et al.* 2017).

Entretanto, no presente trabalho, outros genótipos de HPV de alto risco oncogênico foram identificados. O HPV 18 foi encontrado em 6,1% (4/66) das amostras. Este genótipo é o segundo em prevalência nos cânceres de mama conforme relatam Bae e Kim (2016) em meta-análise envolvendo 24 estudos sobre a infecção pelo HPV e o risco de câncer de mama. O HPV 33, identificado no presente estudo em 4,5% (3/66) das amostras, foi, na China, o único tipo encontrado por Yu *et al.* (2000) com 43,8% de prevalência nos espécimes analisados. Ainda no

presente estudo foram identificados o HPV 31 (1,5%) em um caso isoladamente e, novamente em mais um caso, numa co-infecção com o HPV 52 (1,5%). As co-infecções, quando são detectados dois ou mais diferentes tipos de HPV em uma mesma amostra, têm sido citadas (SOTLAR *et al.* 2004; MORI *et al.* 2011). Recentemente no Reino Unido, Salman *et al.* (2017) detectaram co-infecção por HPVs de alto risco em 46% das amostras e consideraram que estas múltiplas infecções podem interagir ou agir sinergicamente para induzir o desenvolvimento ou conduzir a um aumento da severidade ou do risco da progressão do câncer de mama na presença de outros cofatores.

A distribuição dos resultados da PCR para o DNA do HPV nos três grupos etários, a partir do grupo mais jovem (< 42 anos) para o mais idoso (> 51 anos), demonstrou, nos CM, proporções decrescentes expressivas dos casos HPV-positivos com o aumento da idade (77,8%; 52,2% e 40,3% correspondendo aos grupos etários <42 anos, 42-51 anos e >51 anos, respectivamente) com diferença estatisticamente significativa entre o grupo de mulheres abaixo de 42 anos e o grupo de mulheres acima de 51 anos ($p=0,0070$). Estes resultados indicam a possibilidade de uma associação inversa entre o câncer mamário HPV positivo e o avanço da idade. Ao contrário, um estudo conduzido em Lublin, Polônia (KOLODZIEJ-ANDREJUK *et al.*, 2013) com desenho similar ao do presente estudo demonstrou uma correlação direta entre a presença do DNA do HPV no câncer de mama com o aumento da idade das pacientes. Mas, de fato, um maior número de estudos tem encontrado maior frequência de detecção do DNA do HPV no câncer de mama da mulher jovem e atribuíram este achado às atividades sexuais mais frequentes neste grupo (KROUPIS *et al.*, 2006; LAWSON *et al.*, 2006; AKIL *et al.*, 2008; GLENN *et al.*, 2012; ISLAM *et al.*, 2017; LAWSON; SALMONS; GLENN, 2018).

Além disso, a maior prevalência, neste estudo, de CM HPV positivos na mulher com idade abaixo de 42 anos poderia ser explicada pela modulação da carcinogênese pelos hormônios femininos. Os estrógenos e outros hormônios têm um papel crítico na etiologia do câncer de mama. O HPV tem elementos responsivos aos hormônios na região longa de controle (*Long Control Region* - LCR) que parecem estar associados a uma replicação aumentada destas viroses e a um aumento das proteínas E6 e E7 do HPV na presença destes hormônios esteroides (PATER *et al.*, 1994 ; SHAI; PITOT; LAMBERT, 2008; ALIBEK *et al.*, 2013; ILAHI *et*

al., 2016). Os oncogenes E6 e E7 são conhecidos por suas habilidades de se ligarem e desativarem p53 e pRb, respectivamente. Estudo feito em camundongos deficientes da proteína p53 tratados com estrógenos resultou no desenvolvimento de tumores de colo uterino e de mamas. Curiosamente os tumores mamários desenvolveram num curto período de latência e eram ER positivos. Estas observações sugerem que o estrógeno e a deficiência de p53 atuam sinergicamente para originarem os tumores precoces dependentes de estrógeno (LAWSON *et al.*, 2006; SHAI; PITOT; LAMBERT, 2008). A infecção da mama pelo HPV pode contribuir na redução da idade de início do tumor (ISLAM *et al.*, 2017).

E ainda, estudo *in vivo* e *in vitro* demonstraram que cânceres mamários ER positivos mostravam uma significativa maior prevalência do HPV do que os cânceres de mama ER negativos. Uma alta expressão de ER é uma característica da maioria dos cânceres de mama (IGNATOSKY *et al.*, 2005; OHBA *et al.*, 2014; LAWSON *et al.*, 2015) e estes tumores, pelo menos inicialmente, parecem ser dependentes de efeitos estimulatórios dos estrógenos (ZHAO *et al.*, 2007; OHBA *et al.*, 2014). De fato, lesões mamárias pré-malignas como a hiperplasia ductal atípica, o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) e o carcinoma lobular *in situ* (CLIS) mais fortemente expressam ER, sugerindo a possibilidade de que os cânceres mamários ER positivos possam estar em um estágio inicial da neoplasia (ALLRED; BROWN; MEDINA, 2004; OHBA *et al.*, 2014). Estes dados indicam que o HPV pode desempenhar um papel em um estágio precoce dos cânceres mamários, e sugerem uma relação entre o estrógeno e o início do câncer de mama dependente das proteínas E6 e E7 do HPV (OHBA *et al.*, 2014).

Apesar de uma argumentação consistente favorecer a interpretação de participação dos hormônios como cofatores importantes nos eventos precursores da oncogênese mamária, esta relação é difícil de ser avaliada devido à forte associação entre o uso de contraceptivos orais, por exemplo, e a atividade sexual. A utilização de métodos de contracepção pode influenciar o comportamento sexual, em favor de maior número de contatos, por exemplo, desta forma aumentando a exposição da mulher e o risco para a aquisição de infecções pelo papilomavírus humano (De VILLIERS, 2003; BASEMAN; KOUTSKY, 2005).

Neste estudo o DNA do HPV foi encontrado em 15,8% das MN. Este achado tem sido relatado por outros autores (GUMUS *et al.*, 2006; HENG *et al.*,

2009) e pode se presumir ser este um estágio inicial para indução do câncer de mama pelo HPV. A progressão tumoral também depende do estroma circunvizinho ou microambiente tumoral e não somente da instabilidade genética das células (ARIZTIA *et al.*, 2006). Os eventos precoces no microambiente tumoral precedem a transformação tumorigênica (ANTONSSON *et al.*, 2011). O microambiente, também chamado nicho, tem um papel importante no desenvolvimento do câncer (LEBITOUX; STAMENKOVIC, 2008; LU; WEAVER; WERB, 2012). É um espaço físico e funcional que inclui células normais, matriz extracelular (MEC), fibroblastos estromais, células do sistema imunológico e células vasculares e ainda fornece meio para interagirem (ARIZTIA *et al.*, 2006). O HPV não é suficiente para o desenvolvimento do câncer (GIANNINI *et al.*, 2002). Por outro lado, segundo Damin *et al.* (2004), o HPV no CM não é meramente incidental mas um cofator para o desenvolvimento da doença.

Em acordo, os achados muito mais baixos do DNA do HPV nas MN em comparação com a elevada presença deste vírus nos CM, neste estudo, podem indicar um potencial papel na carcinogênese mamária. Presente na membrana celular de tecidos epiteliais normais, uma molécula de adesão, a caderina-E tem papel essencial para a manutenção da arquitetura tecidual e diferenciação celular (MATTHEWS *et al.*, 2003; HUBERT *et al.*, 2005; LEONG *et al.*, 2010). Uma das causas conhecidas de falha de expressão da caderina-E nos tecidos é atribuída aos oncogenes E6 e E7 do HPV (LAURSON *et al.*, 2010). A perda da expressão de caderina-E está associada com a desdiferenciação, aumento do potencial de invasão e metastático e constitui um importante passo na progressão da maioria dos tumores de origem epitelial (LINDSTROM *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2014). Esta, pode ser uma via comparável à evolução neoplásica no câncer cervical, que tem no HPV o principal fator de risco (WALBOOMERS *et al.*, 1999), e representa um bom modelo para o estudo dos processos metastáticos em razão do passo a passo na sua evolução. O espectro completo da progressão do câncer de colo uterino envolve cérvix normal, neoplasias intraepiteliais, carcinoma *in situ*, câncer invasivo local e as lesões metastáticas distantes (LEE; SHEN, 2012; CAVALCANTE *et al.*, 2014). De forma análoga, a carcinogênese mamária por este vírus pode ter etapas precursoras similares até, gradualmente, atingirem a malignidade (LI; DING; ZHAI, 2015; LAWSON *et al.*, 2015; DELGADO-GARCIA *et al.*, 2017). Em acordo, Salman *et al.* (2017), considerando que existe a possibilidade de que as MN positivas para o

DNA do HPV possam evoluir posteriormente para CM propõem o acompanhamento individual de cada uma dessas mulheres.

Muito embora os dados desta pesquisa possam ser considerados apenas como possibilidades, constituem também resultados expressivos em favor de um papel do HPV na oncogênese mamária. Mesmo que os HPVs não sejam os principais fatores da oncogênese mamária, os resultados obtidos indicam uma consistente possibilidade de que estejam relacionados à gênese do câncer de mama. Talvez, além dos fatores de risco já conhecidos, o HPV deva ser incluído como uma das causas prováveis para a carcinogênese mamária. Em acordo, Lawson *et al.*, (2016b) consideram que os HPVs podem estar envolvidos em alguns tipos mas não todos os cânceres de mama. Assim, cabe comparar esta interpretação com semelhante contexto em relação aos os cânceres de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) até bem pouco tempo associados ao consumo de álcool e ao hábito de fumar. Atualmente já é de amplo conhecimento entre os especialistas desta área de que este tipo de câncer tem no HPV um dos fatores de risco, além do álcool e tabaco (RAGIN; MODUGNO; GOLLIN, 2007; MEHANNA *et al.*, 2013; PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

Dentre os CM, a PCR *nested* com os iniciadores de consenso MY/GP revelou resultados positivos para o DNA do HPV muito mais elevados do que os resultados positivos obtidos na etapa com os iniciadores tipo-específicos E6-E7: 43,7% e 10,7%, respectivamente. Na reação *nested* com MY/GP a sensibilidade de detecção foi observada a partir da adição dos iniciadores internos GP5+/GP6+ que amplificam um fragmento de 150 pb. De acordo com Karlsen *et al.* (1994), tecidos mergulhados e mantidos em solução de formalina, por mais de uma semana, não podem ter seus DNAs amplificados por iniciadores com mais de 200 pb. A formalina é capaz de modificar as bases nucleotídicas e gerar ligações cruzadas internas ao DNA (QUACH *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2014). No presente estudo, todas as amostras foram fixadas pela formalina logo após a coleta cirúrgica e o tempo de cada amostra sob o efeito deste fixador não foi informado. Estas circunstâncias foram provavelmente inapropriadas para a PCR na etapa de genotipagem, deste estudo, onde nove dos onze iniciadores utilizados continham mais de 200 pb. Baay *et al.* (1996), encontraram a correlação entre a eficiência da PCR e a extensão dos produtos da reação e demonstraram que, em material de arquivo, quanto mais curta

a sequencia de nucleotídeos, mais eficiente será a amplificação. Este fato pode explicar, neste trabalho, a baixa detecção da PCR na fase da tipagem com E6-E7 o que também originou os casos não genotipados, e por isso, denominados HPVX.

Estas considerações tornam-se tanto mais relevantes na medida em que, segundo estudos realizados em cânceres invasivos de colo uterino, pode-se esperar menor detecção da região L1 do HPV, e maior, dos oncogenes E6 e E7 em neoplasias avançadas (KARLSEN *et al.*, 1996). Estudos sobre o papel do HPV em tumores de colo uterino demonstraram que, no câncer cervical invasivo a integração do DNA viral ao genoma celular do hospedeiro é comum, precede o desenvolvimento do câncer e leva à perda de regiões do HPV como L1 e L2 e também E1, E2. Desta maneira, o DNA residual integrado, representado principalmente pelas proteínas E6 e E7, passa a ser a única forma presente nas células infectadas. Isto representa um sério desafio para as abordagens de PCR que envolvem iniciadores direcionados para qualquer destas regiões perdidas e a reação tende a ser menos eficiente (MORRIS, 2005). Bem ao contrário, no presente estudo de cânceres invasivos, foi a PCR direcionada para região L1 que propiciou um maior número de resultados positivos para o DNA do HPV. Coube, assim, buscar outra possível interpretação, para a baixa detecção do HPV na etapa de genotipagem da presente pesquisa, a partir de avaliação das condições técnicas encontradas no transcorrer de todo o estudo.

Ademais, apesar da amplificação do gene da β -globina ter sido observada em todos os participantes selecionados, em alguns, esta reação aconteceu de forma relativamente fraca sugerindo que a quantidade ou qualidade do DNA variou de caso para caso. Além disso, a PCR não oferece a vantagem de visualizar diretamente os tecidos que estão sendo examinados, e a lesão de interesse pode não estar representada no material do qual está sendo extraído o DNA. Isto é particularmente limitante nos casos em que o tumor é pequeno e poucas células contêm o DNA viral. Adicionalmente, o presente estudo, pelos seus critérios de inclusão, utilizou amostras muito pequenas por serem constituídas de peças de biópsias mamárias, nos casos dos CM. Este aspecto ganha ainda maior relevância em razão da, extremamente, baixa carga viral do HPV no CM quando comparada a carga viral deste vírus no câncer de colo uterino (LAWSON; SALMONS; GLENN, 2018). Outro fator restritivo deste estudo foi não terem sido utilizadas sondas suficientes para genotipagem de um maior número dos tipos de HPV já conhecidos.

Não foram encontradas, neste estudo, diferenças significativas nas variáveis patológicas (Classificação histológica e graduação de Scarff-Bloom e Richardson modificada por Elston e Ellis para cânceres de mama) entre os grupos HPV positivo e HPV negativo dos CM. Estes dados podem indicar que o HPV não interfere no curso clínico da doença. De forma diferente, resultados opostos foram observados em carcinomas de cabeça e pescoço e pulmão onde a presença de DNA do HPV foi considerada como um marcador de melhor prognóstico (GILLISON *et al.*, 2000; IWAMASA *et al.*, 2000).

Desta forma mais estudos são necessários para melhor compreensão do papel da infecção pelo HPV na carcinogênese mamária, incluindo as mulheres vacinadas contra este vírus. Através disso, no futuro, poderão ser evidenciadas perspectivas que permitam a aplicação de estratégias de saúde mais amplas do que as atuais que se limitam à prevenção do câncer de colo uterino e, assim, se possa incluir a prevenção do câncer mamário nas metas das campanhas de vacinação.

Conclusões

- Foi demonstrada a presença do DNA do HPV em elevada proporção dos tecidos dos CM das mulheres participantes.
- A genotipagem revelou maior frequência dos HPVs de baixo risco, os tipos 6 e 11, sugerindo um potencial papel destes vírus na carcinogênese mamária.
- A distribuição, por grupo etário, dos cânceres mamários positivos para o DNA do HPV ocorreu com maior frequência no grupo mais jovem (<42 anos).

REFERÊNCIAS

AHANGAR-OSKOUE, M. ; SHAHMAHMOODI, S. ; JALILVAND, S. ; MAHMOODI, M. ; ZIAEE, A.A. ; ESMAEILI, H.-A. ; KESHTVARZ, M. ; PISHRAFT-SABET, L. ; YOUSSEFI, M. ; MOLLAEI-KANDELOUS, Y. ; MOKTARI-AZAD, T. ; NATEGH, R. No detection of 'High-risk' Human Papillomaviruses in a Group of Iranian Women with Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p 4061-4065, 2014.

AKIL, N.; YASMEEN, A.; KASSAB, A.; GHABREAU, L.; DARNEL, A. D.; MOUSTAFA, A.-E. A. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. **British Journal of Cancer**, v. 99, p. 404-407, 2008.

ALI, S.H.M.; AL-ALWAN, N.A.S.; AL-ALWANY, S.H.M. Detection and genotyping of human papillomavirus in breast cancer tissues from Iraqi patients. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 20, p. 372-377, 2014.

ALIBEK, K.; KAKPENOVA, A.; MUSSABEKOVA, A.; SYPABEKOVA, M.; KARATAYEVA, N. Role of viruses in the development of breast cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, p. 1-6, 2013.

ALLRED, D.C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. 240-245, 2004.

American Cancer Society (ACS) 2015. Cancer facts and figures 2015, Atlanta, GA. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2015/cancer-facts-and-figures-2015.pdf> - Acessado em 19 de novembro de 2017.

American Cancer Society, (ACS), 2016. Cancer facts and figures 2016, Atlanta, GA. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2016.html> - Acessado em 19 de novembro de 2017.

American Cancer Society (ACS) 2017. Cancer facts and figures 2017, Atlanta, GA. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>

statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf. -
Acessado em 19 de novembro de 2017.

ANDERSSON-ELLSTRÖM, A.; DILNER, J.; HAGMAR,B.; SCHILLER, J.; FORSSMAN. No Serological evidence for non-sexual spread of HPV16. **The Lancet**, v. 344, p. 1345, 1994.

ANTONSSON, A.; SPURR, T.; CHEN, A. C.; FRANCIS, G. D.; MCMILLAN, N. A. J.; SAUNDERS, N. A.; LAW, M.; BENNETT, I. High Prevalence of Human Papillomaviruses in Fresh Frozen Breast Cancer Samples. **Journal of Medical Virology**, v. 83, p. 2157-2163, 2011.

ARIZTIA, E. V.; LEE, C. J.; GOGOI, R.; FISHMAN, D. A. The Tumor Microenvironment: Key to Early Detection. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 43, p. 393-425, 2006.

AZZOPARDI, J.G.; CHEPICK, O.F.; HARTMANN, W.H.; JAFAREY, N.A.; LLOMBART-BOSCH, A.; OZZELO, L.; RILKE, F.; SASANO, N.; SOBIN, L.H.; SOMMERS, S.C.; STALSBERG, H.; SUGAR, J. The World Health Organization Histological Typing of Breast Tumors – Second Edition. **American Journal of Clinical Pathologists**, v. 78, p. 806-816, 1982.

BAAY, M.F.D.; QUINT, W.G.V.; KOUDSTALL, J.; HOLLEMA, H.; DUK, J.M.; BURGER, M.P.M; STOLZ, E.; HERBRINK, P. Comprehensive Study of Several General and Type-Specific Primer Pairs for Detection of Human Papillomavirus DNA by PCR in Paraffin-Embedded Cervical Carcinomas. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 745-747, 1996.

BACKES, D.M.; KURMAN, R.J.; PIMENTA, J.M.; SMITH, J.S. Systematic review of papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. **Cancer Causes Control**, v. 20, p. 449-457, 2009.

BAND, V.; DALAL, S.; DELMOLINO, L.; ANDROPHY E.J. Enhanced degradation of p53 protein in HPV-6 and BPV-1 E6-immortalized human mammary epithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 12, p. 1847-1852, 1993.

BAND, V.; ZAJCHOWSKI, D.; KULESA, V.; SAGER R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor

requirements. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 463-467, 1990.

BASEMAN, J.G.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. S16-S24, 2005.

BECKER, S. A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 131, S36-S39, 2015.

BEHRENS, J.; MAREEL, M.M.; Van ROY, F.M.; BIRCHMEIER, W. Dissecting Tumor Cell Invasion: Epithelial Cells Acquire Invasive Properties after the Loss of Uvomorulin-mediated Cell-Cell Adhesion. **The Journal of Cell Biology**, v. 108, p. 2435-2447, 1989.

BODA, D.; DOCEA, A.O.; CALINA, D.; ILIE, M.A.; CARUNTU, C.; ZURAC, S.; NEAGU, M.; CONSTANTIN, C.; BRANISTEANU, D.E.; VOICULESCU, V.; MAMOULAKIS, C.; TZANAKAKIS, G.; SPANDIDOS, D.A.; DRAKOULIS, N.; TSATSAKIS, A. Human papillomavirus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues. **International Journal of Oncology**, v. 52, p. 637-655, 2018.

BODAGHI, S.; WOOD, L.V.; ROBY, G.; RYDER, C.; ZHENG, Z.M. Could Human Papillomaviruses be Spread through Blood? **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5428-5434, 2005.

BOSHART, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; KLEINHEINZ, A.; SCHEURLLEN, W.; Zur HAUSEN, H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **The Embo Journal**, v. 3, p. 1151-1157, 1984.

BOUVARD, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL-GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; FREEMAN, C.; GALICHET, L.; COGLIANO, V. A review of human carcinogenesis – Part B: Biological agents. **Lancet Oncology**, v. 10, p. 321-322, 2009.

BRIAND, P.; LYKKESFELDT, A.E. An *in vitro* model of human carcinogenesis: epigenetic aspects. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 65, p. 179-187, 2001.

BZHLAVA, D.; EKLUND, C.; DILNER, J. International standardization and classification of human papillomavirus types. **Virology**, v. 476, p. 341-344, 2015.

CAMARA, G.N.N.; CRUZ, M.R.; VERAS, V.S.; MARTINS, C.R.F. Os papilomavírus humanos - HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 1, p. 149-158, 2003.

CANTALUPO, P.G.; KATZ, J.P.; PIPAS, J.M. Viral sequences in human cancer. **Virology**, v. 513, p. 208-216, 2018.

CARBONE, A.; De PAOLI, P. Cancers related to viral agents that have a direct role in carcinogenesis: pathological and diagnostic techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, p. 680-686, 2012.

CARTER, J.J.; MADELEINE, M.M.; SHERA, K.; SCHWARTZ, S.M.; CUSHING-HAUGEN, K.L.; WIPF, G.C.; PORTER, P.; DALING, J.R.; McDOUGAL, J.K.; GALLOWAY, D.A. Human Papillomavirus 16 and 18 L1 Serology Compared across Anogenital Cancer Sites. **Cancer Research**, v. 61, p. 1934-1940, 2001.

CARTER, J.R.; DING, Z.; ROSE, B.R. HPV infection and cervical disease: A review. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 51, p. 103-108, 2011.

CASON, J.; KAYE, J.; PAKARIAN, F.; RAJU, K.S.; BEST, J.M. HPV-16 transmission. **The Lancet**, v. 345, p. 197, 1995.

CAVALCANTE, J.R.; AGUIAR SAMPAIO, J.P.; ALVES MAIA FILHO, J.T.; BRAGA VIEIRA, R.; ELEUTÉRIO JUNIOR, J.; PEREIRA LIMA JUNIOR, R.C.; ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.; CARVALHO DE ALMEIDA, P.R. Progressive loss of E-cadherin immunoexpression during cervical carcinogenesis. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, p. 667-674, 2014.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M.; HERNANDEZ, B. Y. XIAO, W.; KIM, E.; JIANG, B.; GOODMAN, M. T.; SIBURG-SABER, M.; COZEN, W.; LIU,

L.; LYNCH, C. F.; WENTZENSEN, N.; JORDAN, R. C.; ALTEKRUSE, S.; ANDERSON, W. F.; ROSENBERG, P. S.; GILLISON, M. L. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p. 4294-4301, 2011.

CHEN, A.C.H.; KELEHER, A.; KEDDA, M.A.; SPURDLE, A.B.; McMILAN, N.A.J.; ANTONSSON, A. Human Papillomavirus DNA Detected in Peripheral Blood Samples From Healthy Male Blood Donors. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 1792-1796, 2009.

CHUFFA, L.G.A.; LUPI-JUNIOR, L.A.; COSTA, A.B.; AMORIM, J.P.A.; SEIVA, F.R.F. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. **Steroids**, v. 118, p. 93-108, 2017.

DAMIN, A. P. S.; KARAM, R.; ZETTLER, C. G.; CALEFFI, M.; ALEXANDRE, C. O. P. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 84, p. 131-137, 2004.

DALING, J.R.; MADELEINE, M.M.; SCHWARTZ, S.M.; SHERA, K.A.; CARTER, J.J.; McKNIGHT, B.; PORTER, P.L.; GALLOWAY, D.A.; McDOUGAL J.K.; TAMIMI, H. A Population-Based Study of Squamous Cell Vaginal Cancer: HPV and Cofactors. **Gynecologic Oncology**, v. 84, p. 263-270, 2002.

DELGADO-GARCIA, S.; MARTINEZ-ESCORIZA, J.-C.; ALBA, A.; MARTIN-BAYON, T.-A.; BALLESTER-GALIANA, H.; PEIRÓ, G.; CABALLERO, P.; PONCE-LORENZO, J. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. **Biomed Central Cancer**, v. 17: 320. DOI 10.1186/s12885-017-3308-3. 2017.

De LIMA, E.G.; Do AMARAL, C.M.M.; PEIXE, F.C.Q.; GURGEL, A.P.A.D.; Da COSTA SILVA NETO, J.; FREITAS, A.C. Putative Mechanisms of Viral Transmission and Molecular Dysregulation of Mammary Epithelial Cells by Human Papillomavirus: Implications for Breast Cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 16, p. 1-10, 2016.

De MARTEL, C.; PLUMMER, M.; VIGNAT, J.; FRANCESCHI, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International Journal of Cancer**, v. 141, p. 664-670, 2017.

DeSANTIS, C.E.; FEDEWA, S.A.; SAUER, A.G.; KRAMER, J.L.; SMITH, R.A.; JEMAL, A. Breast Cancers Statistics, 2015: Convergence of Incidence Rates Between Black and White Women. **CA: A cancer Journal for Clinicians**, v. 66, p. 31-42, 2016.

De VILLIERS, E.M.; WEIDAUER, H.; OTTO, H.; Zur HAUSEN, H. Papillomavirus DNA in Human Tongue Carcinomas. **International Journal of Cancer**, v. 36, p. 575-578, 1985.

De VILLIERS, E.M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 103, p. 705-708, 2003.

De VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; Zur HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

De VILLIERS, E.M.; SANDSTROM, R. E.; Zur HAUSEN, H.; BUCK, C. E. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. R1-R11, 2005.

DILNER, J.; ANDERSSON-ELLSTRÖM, A.; HAGMAR, B.; SCHILLER, J. High Risk Genital Papillomavirus Infections are Not Spread Vertically. **Reviews in Medical Virology**, v. 9, p. 23-29, 1999.

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

DONG, S.M.; PAI, S.I.; RHA, S.H.; HILDESHEIM, A.; KURMAN, R.J.; SCHWARTZ, P.E.; MORTEL, R.; McGOWAN, L.; GREENBERG, M.D.; BARNES, W.A.; SIDRANSKY, D. Detection and Quantitation of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Carcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 3-6, 2002.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v. 110, p. 525-541, 2006.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I.G.; STOLER, M.; BROKER, T.R.; STANLEY, M.A. The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. **Vaccine**, 30S, p. F55-F70, 2012.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, p. 2-23, 2015.

D'SOUZA, G.; AGRAWAL, Y.; HALPERN, J.; BODISON, S.; GILLISON, M. L. Oral Sexual Behaviors Associated with Prevalent Oral Human Papillomavirus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 1263-1269, 2009.

DÜRST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; Zur HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, p. 3812-3815, 1983.

EDWARDS, S.; CARNE, C. Oral sex and the transmission of viral STIs. **Sexually Transmitted Infection**, v. 74, p. 6-10, 1998.

EIDE, M.L.; DEBAQUE, H. HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer. **Annales de pathologie**, v. 32, p. e15-e23, 2012.

ELIASSEN, A.H.; LIAO, X.; ROSNER, B.; TAMIMI, R.M.; TWOROGER, S.S.; HANKINSON, S. Plasma carotenoids and risk of breast cancer over 20 y of follow-up. **American Journal of Clinical Nutrition**, doi: 10.3945/ajcn.114.105080, p. 1-9, 2015.

ELNOUBI, O.A.E.; ELTYEB, R.; NURI, B.M.; ALKHANJAF, A.A.M. Genotyping of Human Papilloma Virus (HPV) Isolated from Breast Cancer Patients in Radiation and Isotopes Center Khartoum (RICK) - Sudan. **International Journal of Multidisciplinary and Current Research**, v. 5, p. 590-597, 2017.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-410, 1991.

FERNANDES, A.; BIANCHI, G.; FELTRI, A.P.; PÉREZ, M.; CORRENTI, M. Presence of human papillomavirus in breast cancer and its association with prognostic factors. **ecancer**, v. 9, p. 548, 2015.

FREGA, A.; CENCI, M.; STENTELLA, P.; CIPRIANO, L.; De IORIS, A.; ALDERISIO, M.; VECCHIONE, A. Human papillomavirus in virgins and behaviour at risk. **Cancer Letters**, v. 194, p. 21-24, 2003.

FU, L.; WANG, D.; SHAH, W.; WANG, Y.; ZHANG, G.; HE, J. Association of Human Papillomavirus Type 58 with Breast Cancer in Shaanxi Province of China. **Journal of Medical Virology**, v. 87, p. 1034-1040, 2015.

GERVAZ, P.; ALLAL, A.S.; VILLIGER, P.; BÜHLER, L.; MOREL, P. Squamous cell carcinoma of the anus: another sexually transmitted disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 133, p. 353-359, 2003.

GIANNINI, S. L.; HUBERT, P.; DOYEN, J.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. Influence of the Mucosal Epithelium Microenvironment on Langerhans Cells: Implications for the Development of Squamous Intraepithelial Lesions of the Cervix. **International Journal of Cancer**, v. 97, p. 654-659, 2002.

GILLISON, M. L.; KOCH, W. M.; CAPONE, R. B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W. H.; WU, L.; ZAHURAK, M. L.; DANIEL, R. W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D. E.; SHAH, K. V.; SIDRANSKY, D. Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, p. 709-720, 2000.

GLENN, W.K.; HENG, B.; DELPRADO, W.; IACOPETTA, B.; WHITAKER, N.J.; LAWSON, J.S. Epstein-Barr Virus, Human Papillomavirus and Mouse Mammary Tumour Virus as Multiple Viruses in Breast Cancer. **PLOS One**, v. 7, p. e48788, 1-10, 2012.

GLOBOCAN, 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx Acessado em 22/02/2017.

GROVES, I.; COLEMAN, N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. **Journal of Pathology**, v. 235, p.527-538, 2015.

GUMUS, M.; YUMUK, P. F.; SALEPCI, T.; ALIUSTAOGU, M.; DANE, F.; EKENEL, M.; BASARAN, G.; KAIA, H.; BARISIK, N.; TURHAL, N. S. HPV DNA Frequency and Subset Analysis in Human Breast Cancer Patients' Normal and Tumoral Tissue Samples. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 25, p. 515-521, 2006.

HABYARIMANA, T.; ATTALEB, M.; MAZARATI, J.P.; BAKRI, Y.; EL-MZIBRI, M. Detection of human papillomavirus DNA in tumors from Rwandese breast cancer patients. **Breast Cancer**, v. 25, p. 127-133, 2018.

HENG, B.; GLENN, W. K.; TRAN, B.; DELPRADO, W.; LUTZE-MANN, L.; WHITAKER, N. J.; LAWSON, J. S. Human papilloma virus is associated with breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, p. 1345-1350, 2009.

HENNIG, E. M.; SUO, Z.; THORESEN, S.; HOLM, R.; KVINNSLAND, S.; NESLAND, J. M. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 53, p. 121-135, 1999.

HERRERA-ROMANO, L.; FERNÁNDEZ-TAMAYO, N.; GÓMEZ-CONDE, E.; REYES-CARDOSO, J. M.; ORTIZ-GUTIERREZ, F.; CEBALLOS, G. VALDIVIA, A.; PIÑA, P.; SALCEDO, M. Absence of human papillomavirus sequences in epithelial breast cancer in a Mexican female population. **Medical Oncology**, v. 29, p. 1515-1517, 2012.

HSU, C.-R.; LU, T.-M.; CHIN, L. W.; YANG, C.-C. Possible DNA Viral Factors of Human Breast Cancer. **Cancers**, v. 2, p. 498-512, 2010.

HUBERT, P.; CABERG, J.- H.; GILLES, C.; BOUSARGHIN, L.; FRANZEN-DETROOZ, E.; BONIVER, J.; DELVENNE, P. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. **Journal of Pathology**, v. 206, p. 346-355, 2005.

HUSNJAK, K.; GRACE, M.; MAGDIC, L.; PAVELI, K.; Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 88, p. 125-134, 2000.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH on CANCER - IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Human Papillomaviruses**, v. 64, 1995.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH on CANCER - IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. **Human Papillomaviruses**, v. 90, 2007.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH on CANCER - IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS **Human Papillomaviruses**, v. 100B, 2009.

IGNATOSKY, K.M.W.; DZIUBINSKY, M.L.; AMMERMAN, C.; ETHIER, S.P. Cooperative Interactions of HER-2 and HPV-16 Oncoproteins in the Malignant Transformation of Human Mammary Epithelial Cells. **Neoplasia**, v. 7, p. 788-798, 2005.

ILAHY, N.E.; ANWAR, S.; NOREEN, M.; HASHMI, S.N.; MURAD, S. Detections of human papillomavirus-16 DNA in archived clinical samples of breast and lung cancer patients from North Pakistan. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, p. 2497-2502, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). **Estimativa 2016**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> Acessado em: 24 de dezembro de 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). **Estimativa 2018**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf> Acessado em 11 de março de 2018.

ISLAM, S.; DASGUPTA, H.; ROYCHOWDHURY, A.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, N.; ROY, A.; MANDAL, G.K.; ALAM, N.; BISWAS, J.; MANDAL, S.; ROYCHOUDHURY, S.; PANDA, C.K. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indians patients: Clinical and prognostic implication. **Plos One**, 12(2):e0172760. doi: 10.1371/journal.pone.0172760. 2017.

IWAMASA, T.; MIYAGI, J.; TSUHAKE, K.; KINJO, T.; KAMADA, Y.; HIRAYASU, T.; GENKA, K. Prognostic Implication of Human Papillomavirus Infection in Squamous Cell Carcinoma of the Lung. **Pathology Research and Practice**, v. 196, p. 209-218, 2000.

JEKEL, J.F.; KATZ, D.L.; ELMORE, J.G. Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JIN, X. W.; LIPOLD, L.; SIKON, A.; ROME, E. Human papillomavirus vaccine: Safe, effective, underused. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 80, p. 49-60, 2013.

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

JUNG, S.; SPIEGELMAN, D.; BAGLIETTO, L.; BERNSTEIN, L.; BOGGS, D.A.; van den BRANDT, P.A.; BURING, J.E.; CERHAN J.R.; GAUDET, M.M.; GILES, G.G.; GOODMAN, G.; HAKANSSON, N.; HANKINSON, S.E.; HELZLSOUER, K.; HORN-ROSS, P.L.; INOUE, M.; KROGH, V.; LOF, M.; McCULLOUGH, M.L.; MILLER, A.B.; NEUHOUSER, M.L.; PALMER, J.R.; PARK, Y.; ROBIEN, K.; ROHAN, T.E.; SCARMO, S.; SCHAIRER, C.; SCHOUTEN, L.J.; SHIKANY, J.M.; SIERI, S.; TSUGANE, S.; VISVANATHAN, K.; WEIDERPASS, E.; WILLET, W.C.; WOLK, A.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.; ZHANGS.M.; ZHANG, X.; ZIEGLER, R.G.; SMITH-WARNER, S.A. Fruit and Vegetable Intake and Risk of Breast Cancer by Hormone Receptor Status. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 105, p. 219-236, 2013.

KAN, C. Y.; IACOPETTA, B. J.; LAWSON, J. S.; WHITAKER, N. J. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 93, p. 946-948, 2005.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; JENKINS, A.; PETTERSEN, E.; KRISTENSEN, G.; HOLM, R.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2095-2100, 1996.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; CHITEMERERE, M.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. Modifications of Human and Viral Deoxyribonucleic Acid by Formaldehyde Fixation. **Laboratory Investigation**, v. 71, p. 604-611, 1994.

KASHER, M.S.; ROMAN, A. Characterization of Human Papillomavirus Type 6b DNA Isolated from Invasive Squamous Carcinoma of the Vulva. **Virology**, v. 165, p. 225-233, 1988.

KHAN, N. A.; CASTILLO, A.; KORYAMA, C.; KIJIMA, Y.; UMEKITA, Y.; OHI, Y.; HIGASHI, M.; SAGARA, Y.; YOSHINAKA, H.; TSUJI, T.; NATSUGOE, S.; DOUCHI, T.; EIZURU, Y.; AKIBA, S. Human papillomavirus detected in female breast carcinoma in Japan. **British Journal of Cancer**, v. 99, p. 408-414, 2008.

KOŁODZIEJ-ANDREJUK, S.; MACIELAG, P.; PATYRA, K.; MANDZIUK, S.; PACHNIA, D.; MAZURKIEWICZ, M.; POLZ-DACEWICZ, M. The presence of HPV DNA in breast cancer. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 7, p. 86-89, 2013.

KROUPIS, C.; MARKOU, A.; VOURLIDIS, N.; DIONYSSIOU-ASTERIOU, A.; LIANIDOU, E. S. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. **Clinical Biochemistry**, v. 39, p. 727-731, 2006.

LACEY JUNIOR, J.V.; KREIMER, A.; BUYS, S.S.; MARCUS, P.M.; CHANG, S.C.; LEITZMANN, M.; HOOVER, R.N.; PROROK, P.C.; BERG, C.D.; HARTGE, P. Breast Cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. **BMC Cancer**, v. 9, p. 84-92, 2009.

LADERA, M.; FERNANDES, A.; LÓPEZ, M.; PESCI-FELTRI, A.; ÁVILA, M.; CORRENTI, M. Presence of Human Papillomavirus and Epstein-Barr Virus in Breast Cancer Biopsies as Potential Risk Factors. **Gaceta Mexicana de Oncología**, v. 16, p. 103-108, 2017.

LAURSON, J.; KHAN, S.; CHUNG, R.; CROSS, K.; RAJ, K. Epigenetic repression of E-cadherin by human papillomavirus 16 E7 protein. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 918-926, 2010.

LAWSON, J.S.; GUNZBURG, W.H; WHITAKER, N.J. Virus and human breast cancer. **Future Microbiology**. V. 1, p. 33-51, 2006.

LAWSON, J.S.; GLENN, W. K.; HENG, B.; YE, Y.; TRAN, B.; LUTZE-MANN, L.; WHITAKER, N. J. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 101, p. 1351-1356, 2009.

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K.; SALYAKINA, D.; DELPRADO, W.; CLAY, R.; ANTONSSON, A.; HENG, B.; MIYAUCHI, S.; TRAN, D.D.; NGAN, C.C.; LUTZE-MANN, L.; WHITAKER, N. Human Papilloma Viruses and Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 5 article 277, 2015. doi: 10.3389/fonc.2015.00277

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K.; SALYAKINA, D.; CLAY, R.; DELPRADO, W.; CHEERALA, B.; TRAN, D.D.; NGAN, C.C.; MIYAUCHI, S.; KARIM, M.; ANTONSSON, A.; WHITAKER, N.J. Human Papilloma Virus Identification in Breast Cancer Patients with Previous Cervical Neoplasia. **Frontiers in Oncology**, v. 5, article 298, 2016a. doi: 10.3389/fonc.2015.00298

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K.; WHITAKER, N.J. Human Papilloma Viruses and Breast Cancer – Assessment of Causality. **Frontiers in Oncology**, v. 6, p. 207, 2016b doi: 10.3389/fonc.2016.00207

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, article 1, 2018. doi: 10.3389/fonc.2018.00001

LE BITOUX, M. A.; STAMENKOVIC, I. Tumor host interactions: the role of the inflammation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, p. 1079-1090, 2008.

LEE, M.-Y, SHEN, M.-R. Epithelial-mesenchymal transition in cervical carcinoma. **American Journal of Translational Research**, v. 4, p. 1-13, 2012.

LEE, S.H.; VIGLIOTTI, V.S.; VIGLIOTTI, J.S.; PAPPU, S. Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. **BioMed Central Clinical Pathology**, v. 9, p. 1-10, 2009.

LEONG, C.-M.; DOORBAR, J.; NINDL, I.; YOON, H.-S.; HIBMA, M. H. Deregulation of E-cadherin by human papilomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. **British Journal of Dermatology**, v. 163, p. 1253-1263, 2010

LI, N.; BI, X.; ZHANG, Y.; ZHAO, P.; ZHENG, T.; DAI, M. Human papillomavirus infection and sporadic breast carcinoma risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 126, p. 515-520, 2011.

LI, J.; DING, J.; ZHAI, K. Detection of Human Papilomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. **PLOS One**, v. 10, p. 01-10, 2015.

LINDEL, K.; FORSTER, A.; ALTERMATT, H. J.; GREINER, R.; GRUBER, G. Breast cancer and human papilomavirus (HPV) infection: No evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. **The Breast**, v. 16, p. 172-177, 2007.

LINDSTROM, A. K.; STENDAHL, U.; TOT, T.; LINDSTROM, B.; HELLBERG, D. Predicting the Outcome of Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix Using Combinations of Individual Tumor Marker Expressions. **Anticancer Research**, v. 27, p. 1609-1616, 2007.

LÖNING, T.; IKENBERG, H.; BECKER, J.; GISSMANN, L.; HOEPFER, I.; Zur HAUSEN. Analysis of Oral Papillomas, Leukoplakias, and Invasive Carcinoma Carcinomas for Human Papillomavirus Type Related DNA. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, p. 417-420, 1985.

LU, P.; WEAVER, V.M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **The Journal of Cell Biology**, v. 196, p. 395-406, 2012.

MANZOURI, L.; SALEHI, R.; SHARIATPANAHI, S.; REZAIE, P. Prevalence of human papilloma virus among women with breast cancer since 2005-2009 in Isfahan. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, p. 75, 2014.

MARRAZZO, J.M.; STINE, K.; KOUTSKY, L. A. Genital human papillomavirus infection in women who have sex with women: A review. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 183, p. 770-774, 2000.

MARRAZZO, J.M.; KOUTSKY, L. A.; KIVIAT, N.B.; KUYPERS, J.M.; STINE, K. Papanicolaou Test Screening and Prevalence of Genital Human Papillomavirus

Among Women Who Have Sex with Women. **American Journal of Public Health**, v. 91, p. 947-952, 2001.

MATTHEWS, K.; LEONG, C.-M.; BAXTER, L.; INGLIS, E.; YUN, K.; BÄCKSTRÖM, B. T.; DOORBAR, J.; HIBMA, M. Depletion of Langerhans Cells in Human Papillomavirus Type 16-Infected Skin Is Associated with E6-Mediated Down Regulation of E-Cadherin. **Journal of Virology**, v. 77, p. 8378-8385, 2003.

MEHANNA, H.; BEECH, T.; NICHOLSON, T.; EL-HARIRY, I.; McCONKEY, C.; PALERI, V.; ROBERTS, S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer – systematic review and meta-analysis of trends by time and region. **Head and Neck**, v. 35, p. 747-755, 2013.

MENDIZABAL, A. P.; MORALES, J. A.; RAMIREZ-JIRANO, L. J.; PADILLA-ROSAS, M.; MORÁN-MOGUEL,; MONTOYA-FUENTES, H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 114, p. 189-194, 2009.

MINDEL, A.; TIDEMAN, R. HPV transmission – still feeling the way. **The Lancet**, v. 354, p. 2097-2098, 1999.

MONIER, R.; TUBIANA, M. Cancérogenèse. Accroissement de connaissances et évolution des concepts. **Oncologie**, v. 10, p. 319-347, 2008.

MORI, S.; NAKAO, S.; KUKIMOTO, I.; KUSUMOTO-MATSUO, R.; KONDO, K.; KANDA, T. Biased amplification of human papillomavirus DNA in specimens containing multiple human papillomavirus types by PCR with consensus primers. **Cancer Science**, v. 102, p 1223-1227, 2011.

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

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

MOU, X.; CHEN, L.; LIU, F.; SHEN, Y.; WANG, H.; LI, Y.; YUAN, L.; LIN, J.; TENG, L.; XIANG, C. Low Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Chinese Patients

with Breast Cancer. **The Journal of International Medical Research**, v. 39, p. 1636-1644, 2011.

MOUGIN, C.; NICOLIER, M.; DECRION-BARTHOD, A.Z. HPV et cancers: mécanismes de l'oncogenèse. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 405, p. 35-42, 2008.

MUNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K.M.; HAYAKAWA, H.; NGUYEN, C.L.; OWENS, M.; GRACE, M.; HUH, K. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 78, p. 11451-11460, 2004.

MUNGER, K.; JONES, D.L. Human Papillomavirus Carcinogenesis: an Identity Crisis in the Retinoblastoma Tumor Suppressor Pathway. **Journal of Virology**, v. 89, p. 4708-4711, 2015.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer Science**, v. 98, p. 1505-1511, 2007.

NASCIMENTO, E. M.; SPINELLI, M. O.; RODRIGUES, C. J.; BOZZINI, N.; Protocolo de extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 253-255, 2003.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Breast Cancer. Estimated new cases and deaths from breast cancer in the United States in 2015. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> - Acessado em 14/01/2017.

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

OHBA, K.; ICHIYAMA, K.; YAJIMA, M.; GEMMA, N.; NIKAIDO, M.; WU, Q.; CHONG, P.; MORI, S.; YAMAMOTO, R.; WONG, J.E.L.; YAMAMOTO, N. *In Vivo* and *In Vitro* Studies Suggest a Possible Involvement of HPV Infection in the Early Stage of Breast Carcinogenesis via APOBEC3B Induction. **Plos One**, v. 9, p. e97787, 2014.

PAO, C.C.; TSAI, P.L.; CHANG, Y.-L.; HSIEH, T.-T. Non-sexual papillomavirus transmission routes. **The Lancet**, v. 339, p. 1479-1480, 1992.

PATER, M.M.; MITAL, R.; PATER, A. Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. **Trends in Microbiology**, v. 2, p. 229-235, 1994.

PEDRO, A.O.; PINTO-NETO, A.M.; Da COSTA-PAIVA, L.H.S.; OSIS, M.J.; HARDY, E. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 17-25, 2003.

PEREIRA-SUAREZ, A.L.; LORENZETTI, M.A.; LUCANO, R.G.; COHEN, M.; GASS, H.; VAZQUEZ, P.M.; GONZALEZ, P.; PRECIADO, M.V.; CHABAY, P. Presence of Human Papilloma Virus in a Series of Breast Carcinoma from Argentina. **Plos One**, v. 8, e61613, 2013.

PIANA, A.F.; SOTGIU, G.; MURONI, M.R.; COSSU-ROCA, P.; CASTIGLIA, P.; De MIGLIO, M.R. HPV infection and triple negative breast cancers: an Italian case-control study. **Virology Journal**, v. 11, p. 190, 2014.

PSYRRI, A.; DiMAIO, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nature Oncology**, v. 5, p. 24-31, 2008.

PULLOS, A.N.; CASTILHO, R.M.; SQUARIZE, C.H. HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. **Journal of Dental Research**, p. 1-12, 2015.

QUACH, N.; GOODMAN, M.F.; SHIBATA, D. *In vitro* mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. **BMC Clinical Pathology**, v. 4, p. 1-5, 2004.

RAGIN, C. C. R.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S. M. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. **Journal of Dental Research**, v. 86, p. 104-114, 2007.

RAMBOUT, L.; HOPKINS, L.; HUTTON, B.; FERGUSSON, D. Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a

systematic review of randomized controlled trials. **Canadian Medical Association Journal**, v. 177, p. 469-479, 2007.

RANDO, R.F.; GROFF, D.E.; CHIRIKJIAN J.G.; LANCASTER, W.D. Isolation and characterization of a Novel Human Papillomavirus Type 6 DNA from an Invasive Vulvar Carcinoma. **Journal of Virology**, v. 57, p. 353-356, 1986.

RODRIGUES, F. R.; ROCHAEL, M. C. O Possível Envolvimento do HPV no Câncer de Mama. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 23, p. 178-181, 2011.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SALEHPOUR, M.; MEIBODI, N.T.; TEIMOUPOUR, R.; GHORANI-AZAM, A.; SEPAHI, S.; ROSTAMI, S.; MESHKAT, Z. Frequency of Human Papillomavirus Genotypes 6, 11, 16, 18 And 31 in Paraffin-Embedded Tissue Samples of Invasive Breast Carcinoma, North-East of Iran. **Iranian Journal of Pathology**, v. 10, p. 192-198, 2015.

SALMAN, N.A.; DAVIES, G.; MAJIDY, F.; AKINRINADE, H.; PERUMAL, D.; ASHRAFI, G.H. Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: A UK based study. **Scientific Reports**, v. 7, 43591; doi: 10.1038/srep43591. 2017.

SANO, D.; ORIDATE, N. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cells carcinoma. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 21, p. 819-826, 2016.

SCHÄFER, G.; BLUMENTHAL, M.J.; KATZ, A.A. Interaction of Tumor Viruses with Host Cell Surface Receptors and Cell Entry. **Viruses**, v. 7, p. 2592-2617, 2015.

SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.K. Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 31, p. 14-19, 2003.

SEGONDY, M. Papillomavirus et cancer. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 456, p. 57-66, 2013.

SHAI, A.; PITOT, H. C.; LAMBERT, P. F. p53 Loss Synergizes with Estrogen and Papillomaviral Oncogenes to Induce Cervical and Breast Cancers. **Cancer Research**, v. 68, p. 2622-2631, 2008.

SIGAROODI, A.; NADJI, S. A.; NAGHSHVAR, F.; NATEGH, R. EMAMI, H.; VELAYATI, A. A. Human Papillomavirus Is Associated with Breast Cancer in the North Part of Iran. **The Scientific World Journal**, v. 2012, article ID 837191, 8 pages, 2012, doi:10.1100/2012/837191.

SIMÕES, P. W.; MEDEIROS, L. R.; SIMÕES-PIRES, P. D.; EDELWEISS, M. I.; DORNELLES-ROSA, D.; ROSA-SILVA, F.; ROSA-SILVA, B.; ROSA, M I. Prevalence of Human Papillomavirus in Breast Cancer – A *Systematic Review*. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 22, p. 343-347, 2012.

SOHRABI, A.; HAJIA, M.; JAMALI, F.; KHARAZI, F. Is incidence of multiple HPV genotypes rising in genital infections? **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, p. 730-733, 2017.

SONNEX, C.; STRAUSS, S.; GRAY, J.J. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. **Sexually Transmitted Infections**, v. 75, p. 317-319, 1999.

SOTLAR, K.; DIEMER, D.; DETHLEFFS, A.; HACK, Y.; STUBNER, A.; VOLMER, N.; MENTON, S.; MENTON, M.; DIETZ, K.; WALLWIENER, D.; KANDOLF, R.; BULTMANN, B. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 3176-3184, 2004.

STEENBERGEN, R. D. M.; De WILDE, J.; WILTING, S. M.; BRINK, A. A. T. P.; SNIJIDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **Journal of Clinical Virology**, 32S, S25-S33, 2005.

SYRJANEN, K.J.; PYRHONEN, S.; SYRJANEN, S.M.; LAMBERG, M.A. Immunohistochemical Demonstration of Human Papilloma Virus (HPV) Antigens in Oral Squamous Cell Lesions. **British Journal of Oral Surgery**, v. 21, p. 147-153, 1983.

SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S.; KELLOKOSKI, J.; KÄRJÄ, J.; MÄNTYJÄRVI. Human Papillomavirus (HPV) Type 6 and 16 DNA Sequences in Bronchial Squamous

Cell Carcinomas Demonstrated by In Situ DNA Hybridization. **Lung**, v. 167, p. 33-42, 1989.

TAMAROZZI, E.R.; GIULIATTI, S. Understanding the Role of Intrinsic Disorder of Viral Proteins in the Oncogenicity of Different Types of HPV. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 198, 2018.

TAO, Z.; SHI, A.; LU, C.; TAO, S.; ZHANG, Z.; ZHAO, J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cell Biochemistry Biophysics**, v. 72, p. 333-338, 2015.

TRISTÃO, W.; PEREIRA-RIBEIRO, R.M.; De OLIVEIRA, C.A.; BETIOL, J.C.; RIBEIRO-BETTINI, J.S. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, p. 66-70, 2012.

WALBOOMERS, J. M. .; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; PETO, J.; MEIJER, C. J. L. M.; MUNOZ, N. Human Papillomavirus is a Necessary Cause of Invasive Cervical Cancer Worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WANG, T.; CHANG, P.; WANG, L.; YAO, Q.; GUO, W.; CHEN, J.; YAN, T.; CAO, C. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. **Medical Oncology**, v. 29, p. 48-55, 2012.

WANG, Y.; GAPSTUR, S.M.; GAUDET, M.M.; FURTADO, J.D.; CAMPOS, H.; McCULLOUGH, M.L. Plasma carotenoids and breast cancer risk in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. **Cancer Causes & Control**, v. 26, 1233-1244, 2015.

WAZER, D.E.; LIU, X-L.; CHU, Q.; GAO, Q.; BAND, V. Immortalization of distinct human mammary epithelial cell types by human papillomavirus 16 E6 or E7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 3687-3691, 1995.

WEINBERGER, P.M.; YU, Z.; HAFPTY, B.G.; KOWALSKI, D.; HARIGOPAL, M.; BRANDSMA, J.; SASAKI, C.; JOE, J.; CAMP, R.L.; RIMM, D.L.; PSYRRI, A. Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Cancers with Favorable Prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 736-747, 2006.

WIDSCHWENDTER, A.; BRUNHUBER, T.; WIEDEMAIR, A.; MUELLER-HOLZNER, E.; MARTH, C. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, p. 292-297, 2004.

WINER, R.L.; LEE, S.-K.; HUGHES, J.P.; ADAM, D.E.; KIVIAT, N.B.; KOUTSKY, L.A. Genital Human Papillomavirus Infection: Incidence and Risk Factors in a Cohort of Female University Students. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, p. 218-226, 2003.

WONG, S.Q.; LI, J.; TAN, A.Y.-C.; VEDURURU, R.; PANG, J.-M.B.; DO, H.; ELLUL, J.; DOIG, K.; BELL, A.; MACARTHUR, G.A.; FOX, S.B.; THOMAS, D.M.; FELLOWES, A.; PARISOT, J.P.; DOBROVIC, A. Sequence artifacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. **BMC Medical Genomics**, v. 7, p. 1-10, 2014.

WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL – Cancer preventability estimates for diet, nutrition, body fatness, and physical activity – Disponível em <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/preventability-estimates/cancer-preventability-estimates-diet-nutrition> - Acessado em 08/10/16.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Cancer - Breast cancer: prevention and control – Disponível em <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/> - Acessado em 19/11/2017.

WREDE, D.; LUQMANI, Y. A.; COOMBES, R. C.; VOUSDEN, K. H. Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 65, p. 891-894, 1992.

YAN, C.; TENG, Z.P.; CHEN, Y.X.; SHEN, D.H.; LI, T.T.; ZENG, Y. Viral Etiology Relationship between Human Papillomaviruses and Human Breast Cancer and Target of Gene Therapy. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 29, p. 331-339, 2016.

YASMEEN, A.; BISMAR, T. A.; KANDOUZ, M.; FOULKES, W. D.; DESPREZ, P.-Y.; AL MOUSTAFA, A.-E. E6/e7 of HPV Type 16 Promotes Cell Invasion and Metastasis of Human Breast Cancer Cells. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2038-2042, 2007.

YOUNG, S.R.; PILARSKI, R.T.; DONENBERG, T.; SHAPIRO, C.; HAMMOND, L.S.; MILER, J.; BROOKS, K.A.; COHEN, S.; TENENHOLZ, B.; DESAI, D.; ZANDVAKILI, I.; ROYER, R.; LI, S.; NAROD, S.A. The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. **BioMed Central Cancer**, v. 9, p. 86-90, 2009.

ZHAO, C.; MATTHEWS, J.; TUJAGUE, M.; WAN, J.; STRÖM A.; TORESSON, G.; LAM, E.W-F.; CHENG, G.; GUSTAFSSON, J-A.; DAHLMAN-WRIGHT, K. Estrogen Receptor β 2 Negatively Regulates the Transactivation of Estrogen Receptor α in Human Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 67, p. 3955-3962, 2007.

ZHAO, H.; LANGEROD, A.; JI, Y.; NOWELS, K.W.; NESLAND, J.M.; TIBSHIRANI, R.; BUKHOLM, I.K.; KARESEN, R.; BOTSTEIN, D.; BORRESEN-DALE, A.-L.; JEFFREY, S. Different Gene Expression Patterns in Invasive Lobular and Ductal Carcinomas of the Breast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 2523-2536, 2004.

Zur HAUSEN, H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1288, F55-F78, 1996.

Zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and Cancer: from Basic Studies to Clinical Application. **Nature**, v. 2, p. 342-350, 2002.

Zur HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, p. 260-265, 2009.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

MATERNIDADE ESCOLA ASSIS
CHATEAUBRIAND/ MEAC/ UFC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão do Papilomavirus Humano (HPV) no Carcinoma Mamário

Pesquisador: José Roosivelt Cavalcante

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 32681014.0.0000.5050

Instituição Proponente: Maternidade Escola Assis Chateaubriand / MEAC/ UFC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 728.048

Data da Relatoria: 24/07/2014

Apresentação do Projeto:

Expressão do Papilomavirus Humano (HPV) no Carcinoma Mamário.

O objetivo do trabalho é investigar, pelo método da PCR, a expressão do HPV em 150 casos (Carcinomas mamários = 100; Casos controle de tecido mamário normal = 50) do arquivo de blocos parafinados oriundos de peças de mastectomias e quadrantectomias por carcinoma mamário e de mamoplastias redutoras, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a presença do papilomavirus humano (HPV) em tecidos do carcinoma mamário.

Objetivo Secundário:

Efetuar genotipagem para os HPV's 16, 18, 31, 33 e 35 em tecido de tumores mamários usando o método da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Procurar a ocorrência de colicitose nas células do carcinoma mamário através de exames histológicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos para os envolvidos, já que a pesquisa será feita com amostras de tecidos de

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8569

Fax: (85)3366-8528

E-mail: meloventura@uol.com.br

MATERNIDADE ESCOLA ASSIS
CHATEAUBRIAND/ MEAC/ UFC



Continuação do Parecer: 728.048

pacientes já submetidas a procedimentos cirúrgicos. Quanto aos benefícios está principalmente o de adicionar informações de bases científicas sobre o papel do papilomavírus humano (HPV) na gênese do câncer mamário.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para esclarecimentos, dentre outros, da contaminação pelo HPV em pacientes diagnosticadas com câncer de mama na Maternidade Escola.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto será analisado tomando por base os dados coletados nos prontuários e a revisão das laminas de pacientes operadas por câncer de mama e por mamoplastia redutora.

Orçamento consta como financiamento próprio, sugiro que o responsável pelo Laboratório de Patologia, forneça uma carta de anuência concordando com o uso, pelo pesquisador, de seu patrimônio permanente, já que o pesquisador irá arcar com os custos do material utilizado para preparar as laminas, como luvas, álcool etc., com recursos próprios.

Recomendações:

Que o responsável pelo Laboratório de Patologia, forneça uma carta de anuência concordando com o uso, pelo pesquisador, de seu patrimônio permanente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado com recomendação:

Que o responsável pelo Laboratório de Patologia, forneça uma carta de anuência concordando com o uso, pelo pesquisador, de seu patrimônio permanente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado discorda do relator nos seguintes itens: o Termo de fiel depositário do departamento de patologia se encontra anexado no projeto.

Endereço: Rua Cel Nunes de Melo, s/n
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-270
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8569 **Fax:** (85)3366-8528 **E-mail:** meloventura@uol.com.br

MATERNIDADE ESCOLA ASSIS
CHATEAUBRIAND/ MEAC/ UFC



Continuação do Parecer: 728.048

FORTALEZA, 25 de Julho de 2014

Assinado por:
Maria Sidneuma Melo Ventura
(Coordenador)

**ANEXO B – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO EMITIDO PELA MATERNIDADE
ESCOLA ASSIS CHATEAUBRIAND (MEAC) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ**

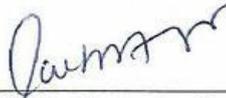
TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. Carlos Augusto Alencar Júnior, Diretor Assistencial, depositário dos documentos consubstanciados dos PRONTUÁRIOS, da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand da Universidade Federal do Ceará, situada à Rua Cel. Nunes Melo S/N, Rodolfo Teófilo, após ter tomado conhecimento do protocolo de pesquisa: **EXPRESSÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA MAMÁRIO** autoriza **José Roosevelt Cavalcante** a coletar dados para instrumentalização do protocolo de pesquisa, ficando este responsável solidariamente, pela guarda e custódia dos dados e informações que receberam do depositário, resguardando os direitos assegurados pela resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, em especial:

- 1) Garantia da privacidade, da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos envolvidos ou de terceiros;
- 2) Emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa.

Fica claro que o Fiel Depositário pode, a qualquer momento, retirar sua **AUTORIZAÇÃO** e também ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional do pesquisador responsável.

Fortaleza, CE 24 de 06 de 20 14.



Prof. Carlos Augusto Alencar Júnior
Gerente de Atenção à Saúde da MEAC(UFC)/EBSERH

Prof. Dr. Carlos Augusto Alencar Júnior
Diretor Assistencial

ANEXO C – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO EMITIDO PELO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ (DPML/FAMED/UFC)

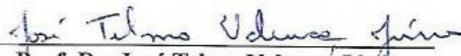
TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior, Vice Chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (DPML/UFC), fiel depositário dos arquivos de lâminas e dos blocos parafinados do Departamento de Patologia e Medicina Legal, situado à Rua Monsenhor Furtado S/N, Rodolfo Teófilo - Fortaleza - Ceará, após ter tomado conhecimento do protocolo da pesquisa: **EXPRESSÃO DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA MAMÁRIO** autoriza: **José Roosevelt Cavalcante** a coletar dados para instrumentalização do protocolo de pesquisa, ficando este responsável solidariamente, pela guarda e custódia dos dados e informações que receberam do depositário, resguardando os direitos assegurados pela resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, em especial:

- 1) Garantia da privacidade, da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos envolvidos ou de terceiros;
- 2) Emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa.

Fica claro que o Fiel Depositário pode, a qualquer momento, retirar sua **AUTORIZAÇÃO** e também ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional do pesquisador responsável.

Fortaleza, Ceará, 01 de setembro de 2014



Prof. Dr. José Telmo Valença Júnior

**Vice Chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará**

ANEXO D – TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO EMITIDO PELO LABORATÓRIO BIOPSE

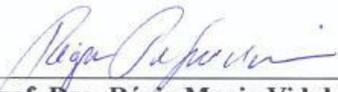
TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, a Sra. Profa. **Dra. Régia Maria Vidal Patrocínio**, Diretora Técnica do Laboratório Biopse de Patologia (Fortaleza - Ceará), fiel depositário dos arquivos de lâminas e dos blocos parafinados do Laboratório Biopse Harmony, situado à Avenida Dom Luiz, 1233 - 1º andar - Edifício Harmony - Aldeota - Fortaleza - Ceará, após ter tomado conhecimento do protocolo da pesquisa: **EXPRESSÃO DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA MAMÁRIO** autoriza: **José Roosevelt Cavalcante** a coletar dados para instrumentalização do protocolo de pesquisa, ficando este responsável solidariamente, pela guarda e custódia dos dados e informações que receberam do depositário, resguardando os direitos assegurados pela resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, em especial:

- 1) Garantia da privacidade, da confidencialidade, do anonimato e da não utilização das informações em prejuízo dos envolvidos ou de terceiros;
- 2) Emprego dos dados somente para fins previstos nesta pesquisa.

Fica claro que o Fiel Depositário pode, a qualquer momento, retirar sua **AUTORIZAÇÃO** e também ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional do pesquisador responsável.

Fortaleza, Ceará, 02 de abril de 2015



Prof. Dra. Régia Maria Vidal Patrocínio
Direção Técnica
Laboratório Biopse Harmony

**ANEXO E – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE POSTER NO XXVIII
CONGRESSO BRASILEIRO DE MASTOLOGIA REALIZADO EM CURITIBA (PR) -
2015**



XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE
MASTOLOGIA
CURITIBA 2015
3 A 6 DE JUNHO | EXPOUNIMED

CÂNCER DE MAMA:
DA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR
AO TRATAMENTO INDIVIDUALIZADO

Certificamos que o trabalho intitulado

**ESTUDO PRELIMINAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA MAMÁRIO EM CENTRO
DE REFERENCIA EM FORTALEZA - CEARÁ**

do(s) autor(es)

**JOSÉ ROOSEVELT CAVALCANTE; CRISTIANE CUNHA FROTA; MÁRCIA VALÉRIA PITOMBEIRA
FERREIRA; PAULO ROBERTO CARVALHO DE ALMEIDA; GIZELE ALMADA CRUZ; LARA MULATO LIMA;
BRUNO MASATO KITAGAWA DE OLIVEIRA; LUIZ GONZAGA PORTO PINHEIRO**

foi apresentado na forma **E-PÔSTER**
durante o **XVIII Congresso Brasileiro de Mastologia**, realizado nos dias 4, 5 e 6 de junho de 2015, no
EXPOUNIMED, em Curitiba.

Dr. Rúffo de Freitas Júnior
DR. RUFFO DE FREITAS JÚNIOR
Presidente da Sociedade Brasileira de Mastologia

Dr. Vinícius Milani Budel
DR. VINÍCIUS MILANI BUDEL
Presidente do XVIII Congresso Brasileiro de Mastologia

Promoção:  **Sociedade Brasileira
de Mastologia**

Realização:  **SBM - PR**
Sociedade Brasileira de Mastologia
Região Sul Paranaense

**ANEXO F – MENÇÃO HONROSA NO XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE
MASTOLOGIA REALIZADO EM CURITIBA (PR) - 2015**



MENÇÃO HONROSA

**ESTUDO PRELIMINAR DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA MAMÁRIO EM CENTRO DE REFERENCIA
EM FORTALEZA – CEARÁ**

dos autores

**JOSÉ ROOSEVELT CAVALCANTE; CRISTIANE CUNHA FROTA; MÁRCIA VALÉRIA PITOMBEIRA FERREIRA; PAULO ROBERTO CARVALHO DE
ALMEIDA; GIZELE ALMADA CRUZ; LARA MULATO LIMA; BRUNO MASATO KITAGAWA DE OLIVEIRA; LUIZ GONZAGA PORTO PINHEIRO**

Dr. Rúffo de Freitas Júnior

DR. RÚFFO DE FREITAS JÚNIOR
Presidente da Sociedade Brasileira de Mastologia



**Sociedade Brasileira
de Mastologia**

Promovido por

Dr. Vinícius Milani Budek

DR. VINÍCIUS MILANI BUDEL
Presidente do XVIII Congresso Brasileiro de Mastologia



SBM - PR
Sociedade Brasileira de Mastologia
Regional Paraná

Realizado por

ANEXO G – CARTA DE ACEITE PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NO PERIÓDICO *CLINICS*

28/04/2018

Gmail - Fwd: CLINICS - Decision on Manuscript ID CLINICS-2017-0465.R1



José Roosevelt Cavalcante <zerusocaval@gmail.com>

Fwd: CLINICS - Decision on Manuscript ID CLINICS-2017-0465.R1

3 mensagens

Cristiane Frota <cristianefrota71@gmail.com>

10 de abril de 2018 13:22

Para: José Roosevelt Cavalcante <zerusocaval@gmail.com>

Segue e-mail da Clinics.

----- Forwarded message -----

From: CLINICS Editorial Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Date: ter, 10 de abr de 2018 11:58

Subject: CLINICS - Decision on Manuscript ID CLINICS-2017-0465.R1

To: <cristianefrota71@gmail.com>

Cc: <clinics@hc.fm.usp.br>

10-Apr-2018

Dear Dr. Frota:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence" for publication in CLINICS.

The publication fee for this article is R\$ 1.500,00. Please print this letter, complete and sign the DECLARAÇÃO below and return it attached to an email to our Editorial Office (clinics@hc.fm.usp.br).

As stated in our Instructions to Authors (www.clinics.org.br), please send the current version of your manuscript to the company American Journal Experts (AJE) for revision. We have been working with AJE for many years and are very satisfied with the quality of their work. Premium Editing is mandatory and you are entitled to a 20% discount. Please make sure you send all sections related to the manuscript for revision: title, running title, abstract, authors contributions, text, references, figure, tables, legends and SUPPLEMENTAL MATERIAL THAT YOU WISH TO PUBLISH. All manuscripts should use American English spelling.

Website: <https://www.aje.com>

Discount code: CLINICS2018

If you have any doubts, please contact Flavia Jaszczak (support@aje.com).

The final version (with all highlighted comments and alterations performed by AJE) and the AJE CERTIFICATE must be sent to clinics@hc.fm.usp.br as soon as possible so that we can proceed with the publication of your article.

Deadline: 25 calendar days

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editorial Board of CLINICS, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Edmund Baracat
Editor, CLINICS
www.clinics.org.br

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins em meu nome, e como representante dos demais autores, que me comprometo a pagar à FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA a quantia de R\$ 1.500,00 (MIL E QUINHENTOS REAIS) para cobrir parcialmente os custos editoriais relativos a publicação de "CLINICS-2017-0465.R1 - Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence", pelo periódico CLINICS.

https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=2&ik=a9444e1d43&jsver=CmFBtIQ-Pmg.pt_BR.&view-pt&search=inbox&th=162bce046a0e3944&siml=162b05e2c66f6785l

**ANEXO H – VERSÃO ORIGINAL DO ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
PELO PERIÓDICO *CLINICS***

Title: Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence

Running title: Human papillomavirus infection and breast cancer

José Roosevelt Cavalcante^I, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro^I, Paulo Roberto Carvalho de Almeida^{II}, Márcia Valéria Pitombeira Ferreira^{II}, Gizele Almada Cruz^{II}, Thales Alves Campelo^{II}, Carolyn Soares Silva^{II}, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima^{III}, Bruno Masato Kitagawa de Oliveira^{IV}, Lara Mulato Lima^{IV}, Laura Magda Costa Feitosa^{IV}, Agostinho Câmara Pinheiro^{IV}, Cristiane Cunha Frota^{II}

^I Universidade Federal Ceará (UFC), Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia e Maternidade Escola Assis Chateaubriand, Fortaleza/CE, Brazil. ^{II} UFC, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Fortaleza/CE, Brazil. ^{III} Instituto Evandro Chagas, Belém/PA, Brazil. ^{IV} UFC, Faculdade de Medicina, Fortaleza/CE, Brazil.

Corresponding author: Dr. Cristiane Cunha Frota, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Rua Monsenhor Furtado s/n, 60441-750 Fortaleza, Ceará, Brazil.

Phone: 55 85 3366-88640; **Mobile:** 55 85 99998-0805

e-mail: cristianefrota71@gmail.com

FUNDING: none

AUTHOR CONTRIBUTIONS: Cavalcante JR designed the study, gathered and analysed the data, and wrote the manuscript. Pinheiro LGP designed the study and analysed and interpreted the data. Almeida PRC and Ferreira MVP performed all histopathological analyses. Cruz GA, Campelo TA, Silva CS, and Lima NGC conducted all molecular biological assays. Oliveira BMK, Lima LM, Feitosa LMC, and Pinheiro AC were responsible

for data acquisition. Frota CC designed the study, analysed and interpreted the data, and wrote and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Title: Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence

Running title: Human papillomavirus infection and breast cancer

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study is to investigate the presence of human papillomavirus (HPV) DNA and genotypes in breast cancer and normal breast tissue samples obtained from women from the northeast region of Brazil.

METHOD: One hundred three breast cancer samples and 95 normal breast samples, as the non-malignant controls, were studied. DNA extraction was verified by human beta-globin gene amplification, and PCR was conducted based on HPV L1-specific consensus primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+, followed by nested multiplex PCR with type-specific primers for the E6/E7 consensus region.

RESULTS: HPV DNA was detected in 51 (49.5%) breast carcinoma samples and 15 (15.8%) normal breast samples ($p < 0.0001$). HPV genotypes 6 and 11 were identified in 15.2% of all samples.

CONCLUSIONS: The high frequency of HPV infection in breast cancer samples indicates a potential role of this virus in breast carcinogenesis in the studied participants.

KEYWORDS: Breast neoplasms, human papillomavirus, HPV, molecular typing, breast cancer.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most common tumour among women throughout the world in both developed and developing countries. Approximately 1.79 million new cases of BC were predicted for 2015, with an estimated death count of 560,407 for the same year (1). In Brazil, approximately 57,960 new cases of BC were expected in 2016, which is equivalent to an estimated risk of 5,620 for each 100,000 women (2).

Several risk factors are described for BC, such as age, family history, weight, physical activity, oral contraceptive use, and alcohol consumption (3). Some viruses may have a role in BC, including mouse mammary tumour virus (MMTV), bovine leukaemia virus (BLV), human papilloma viruses (HPVs), and Epstein-Barr virus (EBV) (4). Regarding HPV and BC, it has been demonstrated that HPV types 16 and 18 can immortalize normal breast (NB) epithelium (5). Reinforcing the putative carcinogenesis in BC, HPV has several ways of subverting an effective immune response that may contribute to persistence (6).

HPV belongs to the *Papillomaviridae* family, which is classified into five genera: α -papillomavirus, β -papillomavirus, γ -papillomavirus, μ -papillomavirus, and ν -papillomavirus (7, 8). HPVs have small, circular, double-stranded DNA genomes that contain three oncogenes, E5, E6, and E7; two regulatory proteins, E1 and E2; and two structural proteins, L1 and L2 (7, 8). The HPV E6 and E7 proteins are known for blocking pRb and p53 tumour suppressor genes, contributing to oncogenesis (6). The conserved region for the capsid protein L1 ORF is used to classify HPV types to different genera or virus species within a genus (7, 8). Polymerase chain reaction (PCR)-based assays using highly conserved amino acid residues in the L1 ORF (MY09 and MY11 primers) segment can be used to identify a large number of HPV types (9, 10). Novel HPV types are confirmed and deposited in The International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center (7, 8, 10).

HPV is present in more than 99% of cervical cancer cases and is considered one of the main risk factors for many penile, vulvar, vaginal, and anal carcinomas and a growing fraction of head and neck squamous cell carcinomas (3, 6, 9, 11, 12). HPV DNA sequences were first reported in BC samples in 1992 (13). Subsequently, several studies have documented the presence of HPV DNA in BC tissues (12, 14, 15). Despite the emergence of HPV in BC as a major public health issue worldwide, only one previous study has been reported in Brazil; it was conducted in Porto Alegre and found HPV 16 and 18 in 24.5% of the cases (16). However, there are geographical differences in the distribution of HPV types found in BC among populations (14, 17, 18). Therefore, this study aimed to identify HPV DNA and genotypes in BC and NB samples obtained from women from the Northeast Region of Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This was a cross-sectional study conducted from July 2014 to December 2015 in Fortaleza, Northeast Brazil. BC biopsy samples from women were collected from histopathological files from the Department of Pathology and Legal Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. NB tissues were collected at the Biopsy Pathology Laboratory, Fortaleza, Brazil. A total of 198 specimens were selected, of which 103 were primary BC samples and 95 were NB tissues with no malignancy. The controls were breast samples obtained from cosmetic reduction mammoplasties of women without a prior history of breast neoplasm.

For the distribution of results, the age groups defined in this study were based on parameters recognized and adopted by mastologists regarding the initiation of breast screening in women (40 years) (1) and a study on the mean age of menopause in Brazil (51

years) according to Pedro et al. (19). Thus, in this study, the women were stratified into three age groups: younger than 42 years, between 42 and 51 years, and older than 51 years.

This project was approved by the Ethical Committee of Maternity School Assis Chateaubriand (MEAC), Federal University of Ceará (protocol 728,048/2014), and the guidelines of the ethical committee were followed in conducting this study. Legal transfer of the custodianship of the tissues samples was obtained from the Department of Pathology and Forensic Medicine (DPML) of the Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

Inclusion and exclusion criteria

Patients were eligible for study participation if they met all of the following criteria: new diagnosis of BC confirmed by histopathology for the BC group or no malignancy with no history of BC for the NB group and positivity of the sample to the human beta-globin (β -globin) gene. Patients who received neoadjuvant chemotherapy or radiation therapy were excluded from the study.

Tissue samples

A skin punch was used to collect a 3-mm-diameter core from formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. All tissue sections were taken after removal of the surgical specimen. Prior to this, haematoxylin and eosin (HE) staining was performed to identify the tumour site in each tissue block. In the NB control samples, areas containing ducts and mammary lobules were selected. The tissue fragments obtained from BC cases and NB controls were placed in 1.5-ml labelled tubes and stored at -20°C until processing.

Deparaffinization of tissue sections

Before deparaffinization, excess paraffin was removed from each tissue section using sterile blades. Deparaffinization of embedded samples was conducted following the protocol described in Nascimento et al. (20). At the end of the process, the tissues were rehydrated in 1 ml of ultrapure water.

Genomic DNA extraction

DNA was extracted using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) following the manufacturer's guidelines. Purity of the extracted DNA was estimated from the ratio between spectrophotometric absorptions at 260 and 280 nm (OD_{260}/OD_{280}).

All samples were examined for DNA integrity via PCR amplification of the human β -globin housekeeping gene. DNA from the breast tissue samples from all participants were probed for a 268-bp product of the β -globin gene via PCR following the protocol described in Saiki et al. (21).

PCR amplification

All β -globin-positive isolates were screened for the HPV L1 conserved region. Nested PCR was conducted with the outer consensus primers MY09/MY11 (product size 450 bp), followed by amplification with the inner primers GP5+/GP6+ to amplify a 150-bp fragment. The PCR amplification conditions were as previously described (18). Illustra PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads predispensed in 0.25-ml tubes (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) were used for PCR amplification.

HPV typing by nested multiplex PCR

GP-E6 3F/5B/6B and type-specific primer sets were used for nested PCR for the exact typing of HPV. The type-specific primers were combined in two multiplex PCR amplifications for identifying genotypes corresponding to low and high oncogenic risk. Primer mix 1 targeted types 16, 18, 31, 45, and 59, whereas primer mix 2 targeted types 33, 6/11, 52, 56, and 58. Primer mix 1 generates fragments with lengths of 457, 322, 263, 215, and 151 bp corresponding to HPV types 16, 18, 31, 59, and 45, respectively. Primer mix 2 amplifies fragments with lengths of 398, 334, 274, 274, 229, and 181 bp corresponding to

HPV types 33, 6/11, 58, 52, and 56, respectively. HPV typing was conducted as described in Sotlar et al. (22).

All procedures were conducted by the same technician using the same methods. False-positive amplifications were addressed using individual sterile sectioning blades for cutting the paraffin-embedded tissues, and sterile glassware were used for all samples. Physical separation of areas for sample handling, PCR preparation, and PCR analysis was diligently practised throughout the study.

DNA sequencing

PCR products derived with the E6/E7 consensus primers were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) prior to sequencing with an Applied Biosystems DNA Sequencer (Applied Biosystems™, Carlsbad, USA) using a BigDye Terminator Cycle Sequencing kit. Sequences were analysed using SecScape software v.2.7 (Applied Biosystems™, Carlsbad, USA) and BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 (BioEdit, Carlsbad, USA). The reference sequence for HPV type 11 isolate 83A.11 (GenBank accession KU298879.1) and the HPV-16 E6/E7 fusion protein gene (GenBank accession FJ229356.1) were used to align the sequences.

Statistical analysis

The data were entered into Microsoft® Excel 2013 and transferred to GraphPad Prism 5 software statistical software (GraphPad Software, San Diego, USA) to conduct descriptive and bivariate analyses. The chi-square test and Fisher's exact two-tailed test were performed, and differences were considered significant at values of $p < 0.05$. Associations of HPV PCR positivity with BC and normal breast samples were performed using Student's t-test, estimating the crude odds ratios (ORs) with their respective 95% confidence intervals (CIs).

RESULTS

The age ranges were from 27 to 97 years (mean of 55.2 ± 13.50 years) for the BC patients and from 24 to 84 years (mean of 41.4 ± 11.67 years) for the NB participants. Amplification of a 268-bp fragment of the human β -globin gene was observed in all studied samples, confirming that all tissue samples had amplifiable DNA in the absence of any inhibition. The distribution of HPV-positive samples based on the different PCR primer sets is shown in Table 1. In the MY/GP PCR assay, 43.7% (45/103) of the BC samples were positive for HPV DNA, whereas 7.4% (7/95) of the NB samples were positive for HPV DNA ($p < 0.0001$, OR = 9.75, 95% CI 4.12-23.11). In the E6/E7 assay, 10.7% (11/103) of the BC samples were positive for HPV DNA, among which, five samples had already been identified as positive with the MY/GP primers. Moreover, 8.4% (8/95) of the NB samples were positive for HPV DNA in the E6/E7 assay. Notably, none of these NB samples were positive with the MY/GP primers. Thus, the overall positivities for HPV DNA were 49.5% (51/103) and 15.8% (15/95) in the BC and NB samples, respectively ($p < 0.0001$, OR = 5.23, 95% CI 2.67-10.26).

The results for HPV DNA positivity for both the BC and NB samples were stratified by age groups (Table 2). HPV DNA was identified in 31% (22/71) of participants who were younger than 42 years – 77.8% (14/18) of the BC group and 15% (8/53) of the NB group ($p < 0.0001$). In the participants aged 42-51 years, HPV DNA was identified in 33.3% (16/48) of all participants – 52.2% (12/23) of the BC group and 16% (4/25) of the NB group ($p = 0.0135$). In the participants older than 51 years, HPV DNA was identified in 35.4% (28/79) of all participants – 40.3% (25/62) of the BC group and 17.6% (3/17) of the NB group ($p = 0.956$). In the BC group, HPV infection was more common in women who were younger than 42 years than in women who were older 51 years ($p = 0.0070$). However, no differences were observed regarding HPV infection status and different age groups in the NB group.

Regarding genotype identification (Table 3), HPV 6/11 was the most common type (15.2%; 10/66) among all participants. Seven (13.7%) BC samples and three (20%) NB samples were positive for HPV type 6/11, followed by two (3.9%) BC samples and two (13.3%) NB samples that were positive for HPV type 18. Additionally, one (6.7%) NB sample and another sample positive for HPV type 52 (6.7%) were identified as positive for HPV type 31. HPV type 33 was also identified in two (3.9%) BC samples and in one (6.7%) NB sample. Non-genotyped HPV types (HPVX) were identified in 78.5% (40/51) of BC samples and in 46.6% (7/15) of NB samples. Regarding samples that were positive for HPV types corresponding to a high oncogenic risk, 7.8% (4/51) were in the BC group and 33.3% (5/15) were in the NB group. Furthermore, for samples positive for HPV types corresponding to a low oncogenic risk, 13.7% (7/51) were in the BC group and 20% (3/15) were in the NB group.

Regarding the age prevalence of the identified HPV types, HPV 6/11 (N = 10) was prevalent across all ages, with a prevalence peak in the > 51 years age group (five cases), followed by three patients younger than 42 years and two patients in the 42-51 years age group. HPV 18 (N = 4) was prevalent in younger participants, presenting in three participants in the 42-51 years age group and one participant who was 25 years old. HPV 33 (N = 3) was equally distributed in the three age groups. HPV 31 and HPV 52 were detected in the younger group (< 42 years). In addition, a 64-year-old patient was positive for HPV 45.

BLAST search results confirmed that product sequences identified in the positive control sample and in positive NB and BC samples corresponded to HPV DNA. The DNA sequences corresponding to the PCR products obtained using E6/E7 consensus primers aligned with the HPV-16 E6/E7 fusion protein gene (FJ229356.1) and the HPV type 11 isolate 83A.11 sequence (KU298879.1), with 100% homology observed for all sequences (Figure 1).

DISCUSSION

This study identified a very high PCR positivity of HPV DNA in BC tissue samples. HPV DNA was detected in 49.5% of BC cases and in 15.8% of NB controls, indicating a statistically significant difference between these two groups. Our results support a potential relationship between HPV infection and breast carcinoma. The OR for HPV positivity was 5.2-fold higher in BC cases than in NB cases. Our results are similar to the findings of a study conducted in Alicante, Spain, which also used embedded BC tissues (14); however, our study identified lower proportions of HPV positivity than did the Spanish study (51.8% and 26.3% for the cases and controls, respectively). In contrast, the values identified in our study were much higher than those described in a meta-analysis of 29 published studies (23), in which the prevalence rates of HPV infection were 23% in BC cases and 12.9% in NB cases. This is the first study conducted in the Northeast Region of Brazil that investigated the association between HPV positivity and BC. A few studies had previously investigated the association between HPV infection and BC in South America, one of them being in Brazil (16) and the other in Argentina (24).

In this study, we used two consensus primer sets and 11 type-specific primers and identified HPV 6/11 as the most frequent (15.2%) viral genotype in the studied population. In Brazil, the HPV genotypes used for vaccination are 6, 11, 16, and 18. However, in the state of Ceará, immunization against HPV was only started in 2014 for girls between 9 and 14 years of age and in 2017 for women between 9 and 45 years and men between 9 and 26 years of age. HPV types 6 and 11 are classified as having a low oncogenic potential for the lower genital tract. In addition, these viral genotypes are generally associated with benign genital warts, known as condylomas (3, 7). Similarly, a study conducted in Heidelberg, Germany, identified HPV types 6 and 11 as the most frequent genotypes in their study of mammary lesions and invasive breast carcinomas (3). In a similar way, a study conducted in Rio de

Janeiro with cervical cancer patients (25) have found low-risk types in tumour samples. Another study also indicated that women who develop viral warts are at a significantly higher risk of developing BC (26); low-risk HPV types are causal agents of genital warts (3, 7). In addition, a study conducted with oral cancer in 187 patients had also suggested that separating high- and low-risk groups based on the HPV status of other body parts might not be appropriate (27). Nevertheless, the majority of the studies have reported the presence of high-risk HPV in BC samples (11, 13, 16, 17, 28).

Notably, we did not detect HPV type 16, which was shown to be prevalent in previous studies on BCs (29-31), in either BC or NB samples. In the southern region of Brazil, a study conducted with paraffin-embedded breast carcinoma samples using specific primers for two HPV types, namely, types 16 and 18, found a predominance of HPV type 16 (16). However, two different studies conducted in Australia on BC samples, one in Sydney (30) and the other in Queensland (11), found HPV type 18 in 48% and 50% of samples, respectively, but neither identified HPV type 16. Therefore, there is a broad range of distribution of HPV genotypes in BC samples, depending on the geographical region. Similarly, studies conducted in China (18) and Syria (28) identified HPV 33 as the most frequent genotype in BC samples, while a study conducted in Canada (32) identified HPV 16 as the predominant genotype. Lawson et al. (33) had already demonstrated that viral genotypes can vary based on different geographic locations and that this variation may result in differential oncogenicity.

Considering the size of a country such as Brazil, it is possible to explain the diversity based on the geographic distribution of this virus. However, the only previous study conducted in Brazil (16) used two primer sets specific for types 16 and 18, which may have made the detection of other genotypes difficult. The introduction of new molecular detection technologies has enabled the discovery of new HPV types, and it is now estimated that there are at least 400 different HPV types (10). Thus, assays using type-specific primers have

limitations that must be considered, as these assays may not reveal the presence of all genotypes in samples.

The distribution of HPV DNA in the three age groups, from the younger (< 42 years) group to the older (> 51 years) group, demonstrated a decrease in the proportion of HPV-positive cases with increasing age (77.8%, 52.2%, and 40.3% corresponding to age groups < 42 years, 42-51 years, and > 51 years, respectively), with a statistically significant difference between the group younger than 42 years and the group older than 51 years ($p = 0.0070$). Thus, the likelihood HPV infection decreases with age. A study conducted in Lublin, Poland (15), with a similar design as ours, demonstrated a direct correlation between the presence of HPV DNA and patient age. In fact, the observation of higher frequency of HPV positivity in younger women has been supported by several studies, which demonstrated an association between HPV infection in younger BC patients and the frequency of their sexual activity (28, 33, 34).

Several mechanisms of viral transmission have been proposed for BC, including skin-to-skin contact and sexual activity (7, 14, 17, 35). In addition, the higher frequency of HPV infection in BC patients younger than 42 years may be explained by the modulation of carcinogenesis by female hormones. Transgenic mice that are infected with HPV in the presence of oestrogen treatment have been shown to have decreased oestrogen receptor-alpha ($ER\alpha$) expression (36). Thus, it has been hypothesized that HPV drives mechanisms to promote cell proliferation (36). In addition, several genes have been identified as being oestrogen-responsive in BC studies following a decrease in $ER\alpha$ expression and an increase in $ER\beta$ expression (37).

Several risk factors, including young age at onset of sexual activity and high number of sexual partners, are related to exposure to HPV. Furthermore, oral contraceptive use is associated with progression from HPV infection to cancer. For example, the use of

contraceptives may contribute to increased sexual behaviour in women and can increase their exposure to and risk of HPV infections (38). The presence of HPV DNA in NB samples might be explained by the notion that HPV infection precedes cancer diagnosis, as already mentioned by other authors (14, 17, 31, 35).

In the current study, HPV DNA was detected in biopsies of archived embedded paraffin tissues. However, all these tissue samples were previously fixed with 10% formaldehyde, which can fragment DNA, modify nucleotide bases and generate internal cross-linking between DNA and proteins (39). According to Karlsen et al. (40), eight hours of fixation is sufficient to inhibit the amplification of DNA products over 421 bp in size. Moreover, the same authors demonstrated that fixation for longer than one week can influence the amplification of DNA fragments over 200 bp in size. Furthermore, Baay et al. (41) demonstrated a correlation between the efficiency of the PCR assay and the length of the PCR product in paraffin-embedded tissue samples.

In summary, we have demonstrated the presence of HPV DNA in a high proportion of BC and NB tissues from women from Northeast Brazil. In addition, we also demonstrated a high frequency of the low-risk viral genotypes, namely, HPV types 6 and 11, in these BC and NB samples. Our results demonstrated the presence of HPV in a significant proportion of malignant breast and non-malignant tissues. The presence of low and high-risk types suggests a potential role of this virus in breast carcinogenesis in the studied participants. Thus, further studies are needed to understand the role of HPV infection in breast carcinogenesis, including among women vaccinated against high-risk HPV types.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Maternity School Assis Chateaubriand (MEAC), the Department of Pathology and Forensic Medicine (DPML), and the Department of Surgery and Mycobacteri Laboratory of the Institute of Biomedicine, all at the Federal University of Ceará, Fortaleza/Ceará, Brazil.

We are also grateful to “Biopse”, Pathology Laboratory, Fortaleza/Ceará, Brazil and to Evandro Chagas Institute, Belém/Pará, Brazil. Additionally, we are thankful to Professor José Eleutério Júnior for revising the manuscript.

FUNDING: none

CONFLICTS OF INTEREST: The authors declare that no conflicts of interest exist.

REFERENCES

1. Cancer Facts & Figures 2017 [Internet]. American Cancer Society 2017. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>.
2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2015. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>.
3. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):R1-11, <http://dx.doi.org/10.1186/bcr940>.
4. Lawson JS, Salmons B, Glenn WK. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). *Front Oncol.* 2018;8:1, <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2018.00001>.
5. Band V, Zajchowski D, Kulesa V, Sager R. Human papilloma virus DNAs immortalize normal human mammary epithelial cells and reduce their growth factor requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1990;87(1):463-7.
6. Munger K, Jones DL. Human papillomavirus carcinogenesis: an identity crisis in the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *J Virol.* 2015;89(9):4708-11, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.03486-14>.
7. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>.
8. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>.
9. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology.* 2013;445(1-2):2-10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.023>.
10. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology.* 2015;476:341-4.
11. Antonsson A, Spurr TP, Chen AC, Francis GD, McMillan NA, Saunders NA, et al. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. *J Med Virol.* 2011;83(12):2157-63, <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22223>.
12. Yan C, Teng ZP, Chen YX, Shen DH, Li JT, Zeng Y. Viral Etiology Relationship between Human Papillomavirus and Human Breast Cancer and Target of Gene Therapy. *Biomed Environ Sci.* 2016;29(5):331-9, <http://dx.doi.org/10.3967/bes2016.043>.

13. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;21(2):95-100.
14. Delgado-Garcia S, Martinez-Escoriza JC, Alba A, Martin-Bayon TA, Ballester-Galiana H, Peiro G, et al. Presence of human papillomavirus DNA in breast cancer: a Spanish case-control study. *BMC Cancer.* 2017;17(1):320, <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-017-3308-3>.
15. Kolodziej-Andrejuk S, Macielag P, Patyra K, Mandziuk S, Pachnia D, Mazurkiewicz M, et al. The presence of HPV DNA in breast cancer. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research.* 2013;7(2).
16. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84(2):131-7, <http://dx.doi.org/10.1023/B:BREA.0000018411.89667.0d>.
17. Salman NA, Davies G, Majidy F, Shakir F, Akinrinade H, Perumal D, et al. Association of High Risk Human Papillomavirus and Breast cancer: A UK based Study. *Scientific reports.* 2017;7:43591, <http://dx.doi.org/10.1038/srep43591>.
18. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, et al. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer.* 2000;7(1):33-6.
19. Pedro AO, Pinto Neto AM, Paiva LH, Osis MJ, Hardy E. [Age at natural menopause among Brazilian women: results from a population-based survey]. *Cad Saude Publica.* 2003;19(1):17-25.
20. Nascimento EM, Spinelli MO, Rodrigues CJ, Bozzini N. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39(3):253-5.
21. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 1986;324(6093):163-6, <http://dx.doi.org/10.1038/324163a0>.
22. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3176-84, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>.
23. Simoes PW, Medeiros LR, Simoes Pires PD, Edelweiss MI, Rosa DD, Silva FR, et al. Prevalence of human papillomavirus in breast cancer: a systematic review. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society.* 2012;22(3):343-7, <http://dx.doi.org/10.1097/IGC.0b013e31823c712e>.
24. Pereira Suarez AL, Lorenzetti MA, Gonzalez Lucano R, Cohen M, Gass H, Martinez Vazquez P, et al. Presence of human papilloma virus in a series of breast carcinoma from Argentina. *PLoS One.* 2013;8(4):e61613, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061613>.
25. de Almeida LM, Martins LFL, Pontes VB, Correa FM, Montenegro RC, Pinto LC, et al. Human Papillomavirus Genotype Distribution among Cervical Cancer Patients prior to Brazilian National HPV Immunization Program. *Journal of environmental and public health.* 2017;2017:1645074, <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1645074>.
26. Atique S, Hsieh CH, Hsiao RT, Iqbal U, Nguyen PAA, Islam MM, et al. Viral warts (Human Papilloma Virus) as a potential risk for breast cancer among younger females. *Computer methods and programs in biomedicine.* 2017;144:203-7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmpb.2017.03.024>.
27. Kim SM, Kwon IJ, Myoung H, Lee JH, Lee SK. Identification of human papillomavirus (HPV) subtype in oral cancer patients through microarray technology. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery.* 2018;275(2):535-43, <http://dx.doi.org/10.1007/s00405-017-4828-9>.

28. Akil N, Yasmeen A, Kassab A, Ghabreau L, Darnel AD, Al Moustafa AE. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. *Br J Cancer*. 2008;99(3):404-7, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6604503>.
29. Hennig EM, Suo Z, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat*. 1999;53(2):121-35.
30. Kan CY, Iacopetta BJ, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(8):946-8, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6602778>.
31. Islam S, Dasgupta H, Roychowdhury A, Bhattacharya R, Mukherjee N, Roy A, et al. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172760, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0172760>.
32. Yasmeen A, Bismar TA, Kandouz M, Foulkes WD, Desprez PY, Al Moustafa AE. E6/E7 of HPV type 16 promotes cell invasion and metastasis of human breast cancer cells. *Cell Cycle*. 2007;6(16):2038-42, <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.16.4555>.
33. Lawson JS, Gunzburg WH, Whitaker NJ. Viruses and human breast cancer. *Future Microbiol*. 2006;1(1):33-51, <http://dx.doi.org/10.2217/17460913.1.1.33>.
34. Glenn WK, Heng B, Delprado W, Iacopetta B, Whitaker NJ, Lawson JS. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(11):e48788, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048788>.
35. Li J, Ding J, Zhai K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136050, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136050>.
36. Shai A, Pitot HC, Lambert PF. p53 Loss synergizes with estrogen and papillomaviral oncogenes to induce cervical and breast cancers. *Cancer Res*. 2008;68(8):2622-31, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5266>.
37. Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Strom A, Toresson G, et al. Estrogen receptor beta2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(8):3955-62, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3505>.
38. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:S16-24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.008>.
39. Wong SQ, Li J, Tan AY, Vedururu R, Pang JM, Do H, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics*. 2014;7:23, <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-7-23>.
40. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest*. 1994;71(4):604-11.
41. Baay M, Quint W, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger M, et al. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(3):745-7.

Table 1 - HPV positivity of breast cancers and normal breasts according to consensus primer sets MY/GP and E6-E7.

Primers	Breast cancer <i>n</i> = 103 (%)	Normal breast <i>n</i> = 95 (%)	<i>p</i> -value [§]	OR [¶] (95% CI [∞])
MY/GP				
Positive	45 (43.7)	7 (7.4)	< 0.0001	9.75 (4.12-23.11)
Negative	58 (56.3)	88 (92.6)		1
E6-E7				
Positive	11 [†] (10.7)	08 (8.4)		
Negative	92 (89.3)	87 (91.6)		
MY/GP and E6-E7 [‡]				
Positive	51 (49.5)	15 (15.8)	< 0.0001	5.23 (2.67-10.26)
Negative	52 (50.5)	80 (84.2)		1

[†] Five of these had already been detected with MY/GP primers; [‡] MY/GP PCR positive, they were all added to sum up the result of 15 HPV DNA positive cases; [§] Student *t*-test; [¶] OD: Odds ratio; [∞] CI: Confidence interval.

Table 2 - HPV positivity obtained with consensus primer sets MY/GP and E6-E7 in breast cancers and in normal breasts according to age range.

Age range (years)	Breast cancer			Normal breast		
	HPV + <i>n</i> = 51 (%)	HPV - <i>n</i> = 52 (%)	Total <i>n</i> = 103 (%)	HPV + <i>n</i> = 15 (%)	HPV - <i>n</i> = 80 (%)	Total <i>n</i> = 95 (%)
< 42	14 (77.8) [†]	4 (22.2)	18 (100)	8 (15)	45 (85)	53 (100)
42-51	12 (52.2)	11 (47.8)	23 (100)	4 (16)	21 (84)	25 (100)
> 51	25 (40.3) [†]	37 (59.7)	62 (100)	3 (17.6)	14 (82.4)	17 (100)

[†] Comparison between the < 42 years and > 51 years groups, $p = 0.0070$ (Fisher's test).

Table 3 - HPV positivity in breast cancers and normal breasts by genotypes and risk group for carcinogenesis.

HPV type	Total <i>n</i> = 66 (%)	Breast cancer <i>n</i> = 51 (%)	Normal breast <i>n</i> = 15 (%)
Genotype			
6/11	10 (15.2)	7 (13.7)	3 (20)
18	4 (6.1)	2 (3.9)	2 (13.3)
31	1 (1.5)	-	1 (6.7)
33	3 (4.5)	2 (3.9)	1 (6.7)
31 and 52	1 (1.5)		1 (6.7)
HPVX [†]	47 (71.2)	40 (78.5)	7 (46.6)
Risk group			
High	9 (13.6)	4 (7.8)	5 (33.3)
Low	10 (15.2)	7 (13.7)	3 (20)
HPVX [†]	47 (71.2)	40 (78.5)	7 (46.7)

[†] HPVX: types not specifically detected by the primers used in this study.

FIGURE LEGEND

Figure 1 - Confirmation of amplification of DNA of HPV extracted from tissue samples of normal breast participants. PCR products of the HPV type 11 isolate 83A.11 sequence (accession No. KU298879.1) were sequenced using an ABI 3130 Genetic Analyser (Applied BiosystemsTM, Carlsbad, CA, USA) and were analysed using the BioEdit Sequence Alignment Editor Program (BioEdit, Carlsbad, CA, USA).

```

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HPV6_11PR135MN
HPV6_11PR235MN
gi|966752075|gb|KU298879.1| Hu GGTAAACAACGAATTAACACTTTTAAAATATCTTCATTAGTTTCTTCTTCTACTGTAGGTGCATATGCAGCATAATTAAAGTGTCTATATTGGTTAA
AGTAAAGATGCCTCCACGTCCTGCAACATCCATAGACCAGTTGTGCAAGACGTTAATCTTCTTTGCACACTCTGCAAATTCAGTGCCTGTTTTGCAGGA

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HPV6_11PR135MN
HPV6_11PR235MN
gi|966752075|gb|KU298879.1| Hu GATTTGCGGATGTAG-TATAAGCACCTAAAGGTTGTGGCGAGACAACCTTCCCTTTGCAGCGTGTGCTGTTGCTTAGA
TTTTCCCTTGCAAGTTCTAAGCAACAGGCACACGC-TGCAAAGG---GAAAGTTGTCTGCCACACAACCTTTAGGTTCTTATAGGCATATGC-ATATATC
ATGCACTGACCACCGCAGAGATATATGCATATGCCTATAAGAACCTAAAGGTTGTGTGGCGAGACAACCTTCCCTTTGCAGCGTGTGCTGTTGCTTAGA

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HPV6_11PR135MN
HPV6_11PR235MN
gi|966752075|gb|KU298879.1| Hu ACTGCAAGGAAAATTTAACCAATATAGACACTTTAATATGCTGCATATGCACCTACAGTAGAAGAAGAACTAATGAAGATATTTAAAAGTGTTAAT
TCTGCGGTGGTAA-TGAATTTCTTGCAAAAGCCGGGGGGATTTTATGCATTTCTTAAAACCTTAAGGGTGGGGGGGGACAACCTTT-----CCTTT
ACTGCAAGGAAAATT-AACCAATATAGACACTTTAATATGCTGCATATGCACCTACAGTAGAAGAAGAACTAATGAAGATATTTAAAAGTGTTAAT

      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
HPV6_11PR135MN
HPV6_11PR235MN
gi|966752075|gb|KU298879.1| Hu TCGTTGTTACCTGTGTCAACAAGCCGTTGTGTGAAATAGAAAACTAAAGCACATATTGGGAAAGGCACGCTTCATAAAACTA--AATAACAGTGGAAAG
TCGCCGGGCTTGTG-CTTAAAACTCCAGGAAAATTAACCATATAGACCTTTATTATGGGATAGCCCTCCGCTAGAGAAAACTAATGAAATTTTAAAGG
TCGTTGTTACCTGTGTCAACAAGCCGTTGTGTGAAATAGAAAACTAAAGCACATATTGGGAAAGGCACGCTTCATAAAACTA--AATAACAGTGGAAAG

```

APÊNDICE A – DADOS BRUTOS DE TODOS OS CÂNCERES DE MAMAS (CM, N=103) DA PESQUISA EXIBINDO IDADE, CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA E POSITIVIDADE OU NEGATIVIDADE PARA O DNA DO HPV

Casos	Câncer de mama (CM)			
	Idade (anos)	Classificação Histológica	HPV positivo	HPV negativo
1	86	CDI		X
2	78	CDI		X
3	36	CDI	X	
4	56	CDI		X
5	45	CDI	X	
6	65	CDI		X
7	43	CLI		X
8	27	CDI	X	
9	61	CDI		X
10	54	CDIS		X
11	54	CDI		X
12	67	CDI		X
13	51	ND	X	
14	62	CDI		X
15	48	CDI	X	
16	28	CDI	X	
17	97	CDI	X	
18	39	CDI	X	
19	58	CDI	X	
20	66	CDI	X	
21	41	CDI	X	
22	50	CLI	X	
23	48	CDI	X	
24	82	CDIS	X	
25	37	CDI		X
26	46	CDI		X
27	74	ND	X	
28	63	CDI		X
29	45	CDI	X	
30	58	CDI		X
31	40	CDI		X
32	67	CDI	X	
33	65	CDI	X	
34	40	CDI	X	
35	64	CDIS	X	
36	55	CDI		X
37	68	CDI		X
38	40	CDI	X	
39	54	CLI	X	
40	57	CDI	X	
41	63	CDI	X	
42	56	CDI	X	
43	80	CDI	X	
44	60	CDI	X	
45	58	CDI		X
46	48	CDI	X	
47	62	CDI	X	
48	59	CDI		X
49	61	CDI		X
50	62	CDI	X	
51	51	CDI	X	

52	47	CDI	X	
53	48	CLI	X	
54	47	CDI	X	
55	72	CDI		X
56	57	CDI		X
57	51	CDI		X
58	57	CDI		X
59	58	CDI		X
60	64	CDI		X
61	54	CLI		X
62	71	CDI		X
63	62	CDI		X
64	43	CDI		X
65	48	CDI		X
66	64	CDI		X
67	52	CDIS		X
68	66	CDI	X	
69	46	CDI	X	
70	32	CDI	X	
71	70	CDI	X	
72	55	CDI	X	
73	60	CDI		X
74	36	CDI	X	
75	56	CDI	X	
76	45	CDI		X
77	86	CDIS		X
78	43	CDI		X
79	57	CDIS		X
80	40	CDI		X
81	34	CDI		X
82	55	CDI		X
83	48	CDI		X
84	78	CDI		X
85	45	CDI		X
86	42	CDIS		X
87	54	CDIS	X	
88	68	CDI	X	
89	65	CDI	X	
90	39	CDIS	X	
91	55	CDI		X
92	37	CDI	X	
93	72	CDI	X	
94	79	CDI	X	
95	40	CDI	X	
96	61	CDI		X
97	59	CDI		X
98	34	CDI	X	
99	58	CDI		X
100	60	CDI		X
101	32	CLI	X	
102	63	CDI		X
103	46	CDI		X

Fonte: Próprio autor (2018). CDI – carcinoma ductal invasivo; CDIS – carcinoma ductal *in situ*; CLI – carcinoma lobular invasivo; ND – não definido, se refere à dois casos sem definição, no laudo, quanto à classificação histológica. Número de casos HPV positivos=51. Número de casos HPV negativos=52.

APÊNDICE B – DADOS BRUTOS COM TODAS AS AMOSTRAS DE MAMAS NORMAIS (MN, N=95) DA PESQUISA EXIBINDO IDADE E POSITIVIDADE OU NEGATIVIDADE PARA O DNA DO HPV

Amostras	Mama normal (MN)		
	Idade (anos)	HPV positivo	HPV negativo
1	44		X
2	39		X
3	25		X
4	24		X
5	58		X
6	25	X	
7	68		X
8	49	X	
9	29	X	
10	49		X
11	39		X
12	56		X
13	24		X
14	84		X
15	52		X
16	29	X	
17	48		X
18	37		X
19	38		X
20	56		X
21	41		X
22	36		X
23	48		X
24	48		X
25	39	X	
26	31		X
27	39		X
28	31		X
29	41		X
30	50		X
31	28		X
32	49		X
33	62		X
34	64		X
35	36		X
36	43		X
37	32		X
38	43		X
39	58		X
40	30		X
41	44		X
42	35		X
43	44		X
44	35		X
45	55	X	
46	53	X	
47	50		X
48	49	X	
49	27		X
50	50	X	
51	53		X
52	43		X

53	67		X
54	39		X
55	53		X
56	34		X
57	48		X
58	34		X
59	42		X
60	51		X
61	37		X
62	41		X
63	36		X
64	43		X
65	33		X
66	32		X
67	28		X
68	57		X
69	38		X
70	31		X
71	47		X
72	27		X
73	29		X
74	54		X
75	36		X
76	33		X
77	27		X
78	44		X
79	41		X
80	37		X
81	27		X
82	27		X
83	68	X	
84	48		X
85	30		X
86	32	X	
87	34		X
88	41	X	
89	49	X	
90	28		X
91	33	X	
92	34	X	
93	30		X
94	46		X
95	32		X

Fonte: Próprio autor (2018). Número de amostras HPV positivas = 15. Número de amostras HPV negativas = 80.