



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MATHEUS DIÓGENES ALMEIDA

**DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS DE MAMA DE
MULHERES ATENDIDAS EM SERVIÇO DE REFERENCIA EM MASTOLOGIA
NO CEARÁ**

FORTALEZA
2019

MATHEUS DIÓGENES ALMEIDA

DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS DE MAMA DE
MULHERES ATENDIDAS EM SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM MASTOLOGIA NO
CEARÁ

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biologia.

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.

FORTALEZA

2019

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)

A449d Almeida, Matheus Diógenes.

Detecção de papilomavírus humano em amostras de mama de mulheres atendidas em serviço de referência em mastologia no Ceará / Matheus Diógenes Almeida. – 2019.
38 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota.

1. Câncer de Mama. 2. Biologia molecular. 3. Papilomavírus Humano. 4. PCR. I. Título.

CDD 570

MATHEUS DIÓGENES ALMEIDA

DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM AMOSTRAS DE MAMA DE
MULHERES ATENDIDAS EM SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM MASTOLOGIA NO
CEARÁ

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biologia.

Aprovada em: 18/11/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristiane Cunha Frota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Lucas de Lima Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Soraya de Oliveira Sancho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Rosimeire, e ao meu pai, Vanderlan, por serem os principais pilares dessa trajetória. Mesmo com amores que, por vezes, são tortos, compreendo que possuem as melhores intenções.

À minha irmã, Jhéssica, que, apesar dos atritos, sempre se mostrou ao meu lado.

À minha tia, Socorro, e seu marido, Alexandre, que sempre estiveram próximos a minha família, prontos para amparar sempre que necessário.

À minha melhor amiga, Iane, que mesmo quando distante por longos períodos, mantém essa amizade leve e primorosa, como deve ser.

À Mari, Ju, Grazy, Bia, Andreza e Anderson, que juntos, formamos os "Polonizadores uspulsos". O suporte de vocês durante a graduação inteira e a disposição em compartilhar angústias foi indispensável nessa jornada. Vivenciar os campos com vocês foram experiências inesquecíveis.

À Letícia, agregada dos "Polonizadores", por ser uma conselheira e amiga excepcional.

À UFC, e seu corpo docente.

À minha orientadora Cristiane Frota, pelo acolhimento quando fui procurá-la para estagiar no Laboratório de Micobactérias.

À minha supervisora Soraya Sancho, por todos os ensinamentos e instruções fundamentais, além de sua incrível amizade.

Aos colegas do Laboratório de Micobactérias: Susy, Carol, Kalil, Lucas, Thales, Cláudio, Paulo Rafael e Socorro, por toda a assistência e camaradagem, mesmo em dias conturbados.

À banca examinadora, Prof. Dr. Lucas de Lima Nogueira e Dra. Soraya de Oliveira Sancho, pelo tempo, colaborações e sugestões.

Ao Iago Vasconcelos, por ter me escolhido para fazer parte de sua vida e ter escolhido fazer parte da minha. Por ter construído comigo uma relação na qual o respeito e a conversa são as prioridades e por ter me mostrado que o amor é mais fácil se você é paciente.

RESUMO

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais comum entre brasileiras, possuindo a maior taxa de mortalidade dentre os cânceres. Possui etiologia multifatorial e fatores de riscos conhecidos, bem como causas desconhecidas. Alguns vírus, como o HPV, podem ter relação com o surgimento dessa neoplasia. Os mais de 200 tipos de HPV são classificados de acordo com o potencial oncogênico. O vírus é altamente contagioso podendo ser transmitido pelo contato direto com pele ou mucosa infectada, dessa forma sendo também sexualmente transmitido. Por possuir mecanismos oncogênicos bem elucidados e ser o responsável pela quase totalidade dos casos mundiais de cânceres cervicais, o HPV tem sido estudado quanto a sua função na patogênese do câncer de mama. Alguns métodos de diagnóstico para detecção e prevenção de câncer, como a citologia oncótica, não são específicos para o vírus, sendo sugestivos de infecção por HPV baseado no padrão citopático. A reação em cadeia da polimerase (PCR), no entanto, é um método eficaz de detecção do vírus, que realiza a amplificação do DNA viral. O presente trabalho teve como objetivo determinar a positividade do HPV em amostras mamárias e compreender sua frequência relacionada ao tipo de amostra e à idade das pacientes. Desse modo, foi extraído e purificado o DNA de diversas amostras biológicas, para posterior amplificação por técnica de nested PCR para a região intergênica E6-E7 e genotipagem de 11 tipos de HPV (16, 18, 31, 45, 59, 6/11, 33, 52, 56 e 58). A positividade para o vírus HPV foi de 20,3%, sendo de 7,6% para as amostras de biópsias e de 12,7% para as amostras de ducto mamário. Os achados da genotipagem foram compostos pelos HPVs 6/11, 16 e 33, sendo o 6/11 o tipo que apresentou maior frequência. Apenas 12,5% das pacientes que apresentaram diagnóstico positivo para HPV eram portadoras de câncer de mama, sendo 3,1% das pacientes com idade inferior a 42 anos e 9,4% com idade entre 42 e 51 anos. Este estudo indica a utilidade do nosso protocolo de PCR para detecção de HPVs de amostras de mama e tipagem de HPV. Quando comparamos nossos resultados com outros estudos, existem diferenças entre a frequência e a ordem dos genótipos do HPV detectados. Estas diferenças podem ser justificadas pelo tipo de amostra analisada, pelo método de detecção do HPV e por diferenças geográficas. A análise acerca da relação do vírus com a variável demográfica poderia ter sido mais satisfatória com a presença dos dados demográficos completos.

Palavras-chaves: Câncer de Mama. Biologia molecular. Papilomavírus Humano. PCR.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common malignant neoplasm among Brazilians, representing the highest mortality rate amongst cancers. It has multifactorial aetiology and known risk factors, as well as unknown causes. Some viruses, such as HPV, may be related with the occurrence of this neoplasm. Over 200 types of HPV are classified according to their oncogenic potential. The virus is highly contagious for it may be transmitted by direct contact with infected skin or mucosa, being also sexually transmitted. Because it has well elucidated oncogenic mechanisms and be the responsible for almost all cervical cancer cases worldwide, the HPV has been studied for its role on breast cancer pathogenesis. Some methods of diagnosis for detection and preventions of this kind of cancer, such as oncotic cytology, are not specified for this virus, incurring the infection by HPV on the cytopathic pattern. Polymerase chain reaction, however, is an efficient method for detection of this virus which amplifies the viral DNA. The objective of this current article is to determine the HPV positivity in mammary samples and understand its frequency related to the type of sample and the age of the patients. For this matter, viral DNA from several samples was extracted and purified for further amplification of the intergenic regions E6-E7 by nested PCR technique and genotyping of 11 different kinds of HPV (16, 18, 31, 45, 59, 6/11, 33, 52, 56 and 58). The positivity rate found for HPV infections was 20.3%, being that 7.6% from biopsy samples and 12.7% from ductal samples. The genotyping finds were composed by HPVs 6/11, 16 and 33, in which 6/11 presented the highest frequency. Only 12.5% of the patients who presented positive diagnosis for HPV infection were carriers of breast cancer, in which 3.1% of the patients were younger than 42 years old and 9.4% were between 42 and 51 years old. This study indicates the utility of our PCR protocol for HPV's detection on mammary samples and HPVs' typing. When comparing our results with other studies there are differences between the frequency and the genotypes groups of detected HPVs. Those differences may be justified by the type of analysed sample, HPV detection method and geographic differences. The analysis relating the virus with the demographic variable could have been more satisfactory with the presence of complete demographic data.

Keywords: Breast Cancer. Human Papillomavirus. Molecular biology. PCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Local do estudo	15
3.2	Tipo e período do estudo	15
3.3	População do estudo	15
3.4	CrITÉrios de escolha das amostras	15
3.5	Pré-tratamento das amostras	16
3.6	Extração de ácidos nucleicos	16
3.7	Detecção de HPV por PCR.....	17
3.8	Interpretação dos resultados	20
3.9	Considerações éticas	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Análise dos géis	22
4.2	Frequência de HPV nas amostras de estudo.....	24
4.3	Frequência dos tipos de HPV em diferentes tipos de amostras	24
4.4	Relação do HPV e do câncer de mama com a variável demográfica	24
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32
	ANEXO A	35
	ANEXO B.....	39

1 INTRODUÇÃO

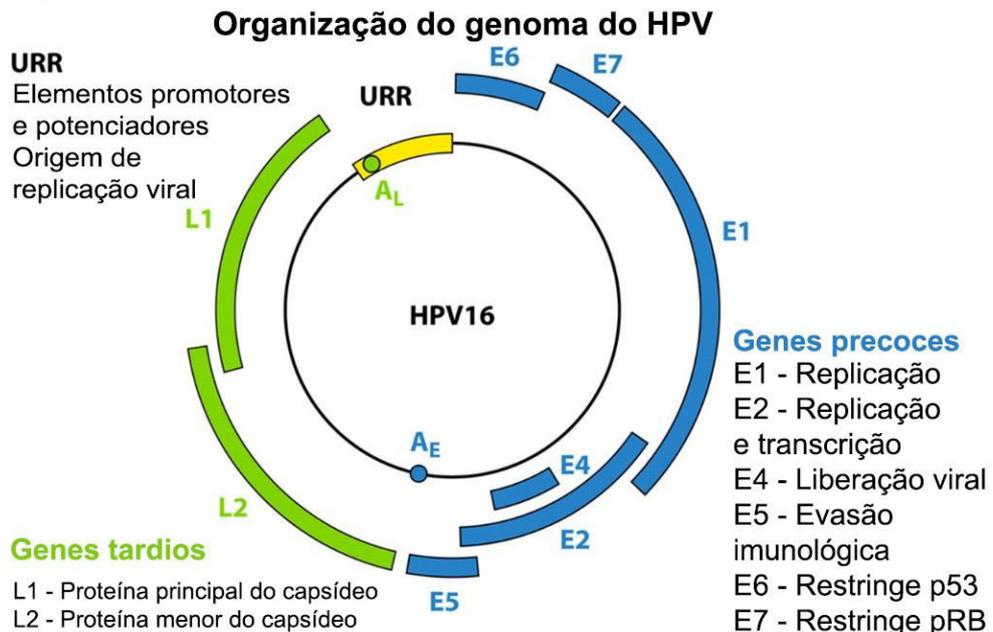
Globalmente, o câncer de mama é o segundo tumor maligno mais frequente ocorrente em mulheres, atrás apenas de cânceres de pele do tipo não melanoma (BRASIL, 2017). Corresponde a principal causa de morte por câncer entre mulheres, sendo estimado por causar cerca de 522 mil mortes para o ano de 2012 no Brasil, o equivalente a 14,7% do total de óbitos. O câncer de mama possui a maior taxa de mortalidade dentre os cânceres, correspondendo a 12,9 mil mortes a cada 100 mil casos, entretanto é considerado com letalidade baixa, uma vez que a taxa de mortalidade é inferior a um terço da taxa de incidência. No Brasil, a estimativa de casos novos para os anos de 2018 e 2019 é de 59.700 para cada ano, sendo 56,33 casos para cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2017).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, envolvendo menarca precoce (antes dos 12 anos), menopausa tardia (após os 55 anos), nuliparidade, primeira gravidez após os 30 anos, uso de anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal na menopausa, sedentarismo, pré-disposição genética, entre outros (BRASIL, 2017; LAWSON; SALMONS; GLENN, 2018). O câncer de mama possui tanto fatores de riscos bem estabelecidos como também causas desconhecidas até o momento, porém já se sabe que alguns vírus podem desempenhar um papel no surgimento dessa neoplasia, sendo eles o vírus do tumor mamário de ratos (MMTV), o vírus da leucemia bovina (BLV), o vírus Epstein-Barr, e o papilomavírus humano (HPV) (LAWSON; SALMONS; GLENN, 2018).

Pertencente à família Papillomaviridae, os HPVs podem ser classificados dentre os gêneros α -papillomavirus, β -papillomavirus, γ -papillomavirus, μ -papillomavirus e ν -papillomavirus (BERNARD *et al.*, 2010; CAVALCANTE *et al.*, 2018). Eles possuem DNA circular de fita-dupla, com um genoma de cerca 8 mil pares de bases, constituído por cerca de oito fases de leitura aberta, compreendendo no mínimo seis genes denominados E (*early*) que se expressam de forma antecipada e dois genes denominados L (*late*), que se expressam de forma tardia (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005) (FIGURA 1). Os genes E1, E2, E3, E4, E5, E6, e E7 constituem a região E do genoma. E1 está relacionado com a replicação viral, enquanto E2 está relacionado com a transcrição e a replicação. E4 está ligado à maturação do vírus e alteração da matriz intracelular. Os genes E5, E6, e E7 são oncogenes associados à transformação celular (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; BERNARD *et al.*, 2010). A região L do genoma é formada pelos genes L1 e L2, sendo o primeiro o responsável por codificar uma proteína fundamental homônima do capsídeo do vírus e também servindo de base para a produção das atuais vacinas contra HPV. Além disso, a sequência de nucleotídeos do L1 define

se um HPV é de um novo “tipo”. Para um HPV ser classificado como um novo tipo, ele necessita possuir no mínimo 10% da sequência de L1 distinta de qualquer outro tipo de HPV. E finalmente, L2 codifica uma proteína estrutural homônima também constituinte do capsídeo viral (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; BERNARD *et al.*, 2010).

Figura 1 – Ilustração da organização genômica de um típico tipo de HPV



Fonte: adaptado de Stanley (2012). Demonstração da organização genômica do HPV 16. O genoma contém regiões precoces (Early, E) e tardias (Late, L) que se relacionam com a posição dos genes dentro do genoma e seu tempo de expressão durante o ciclo de vida viral. A região inicial codifica vários genes que funcionam ao nível da replicação e transcrição viral: os genes E1, E2, E6 e E7. A região tardia codifica proteínas estruturais virais, com L1, a principal proteína do capsídeo, e L2, a menor proteína do capsídeo.

A relação do HPV com o câncer de mama ainda está sendo estudada, mas já se sabe que o vírus está relacionado com até 99,7% dos casos de câncer cervical no mundo (RAMA *et al.*, 2008; BRINGHENTI *et al.*, 2010). Com aproximadamente 200 tipos de HPV com seus genomas sequenciados, a classificação desses tipos é realizada em relação ao seu potencial de formação de neoplasias (BRINGHENTI *et al.*, 2010; BRASIL, 2014). São considerados de alto risco os tipos que possuem maior relação com o câncer cervical, como os HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 e 70, e considerados de baixo risco os tipos que possuem maior relação com lesões benignas, como os HPVs 6, 11, 42, 43 e 44 (BRINGHENTI *et al.*, 2010). Dentre os que possuem maior potencial carcinogênico, os tipos 16 e 18 são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical mundiais (BRINGHENTI *et al.*, 2010; BRASIL, 2014).

O HPV causa tumores benignos, chamados papilomas, no epitélio da pele ou mucosas (DE VILLIERS *et al.*, 2004) e é transmitido pelo contato direto com pele ou mucosa

infectada, dessa forma, além do vírus ser sexualmente transmissível, não necessita de penetração vaginal ou anal, mostrando o quão alta é sua chance de contágio (BRASIL, 2014). As áreas anogenitais são as mais acometidas pelas lesões clínicas. Contudo, o vírus pode acometer qualquer outra área do corpo, necessitando apenas de uma solução de continuidade, ou seja, ruptura da integridade de pele ou mucosa (BRASIL, 2014). Assim, o HPV tem sido estudado quanto ao seu papel na patogênese do câncer de mama, visto que é notória a grande ocorrência dessa neoplasia no Brasil e no mundo.

Os genes que controlam a estabilidade e o reparo do DNA e o crescimento celular estão entre alguns dos genes que são relacionados no processo de carcinogênese. Os genes que possuem função na regulação da proliferação celular, fazem parte do grupo de genes supressores de tumor (CAVALCANTE JÚNIOR; KLUM; MAIA, 2002) e são os alvos dos mecanismos oncogênicos do HPV que induzem à imortalização das células e à carcinogênese (ZUR HAUSEN, 2000). Os genes p53 e Rb são os principais alvos pelos já citados oncogenes do HPV. O produto da transcrição do p53 é uma proteína nuclear homônima de 53 kD. Também conhecida como “guardiã do genoma”, a proteína 53 interrompe a proliferação de células que tiveram seu DNA lesionado por agentes físicos, ativando a transcrição de genes de reparo do DNA. Como exemplo, o gene p21, que codifica a proteína 21, capaz de inibir quinases dependentes de ciclinas (CDKs), o que suspende a mitose na fase G1, permitindo a correção do DNA pelo gene GADD-45, também ativado pela p53. Adicionalmente, caso o DNA não seja reparado adequadamente, a p53 ativa a apoptose (CAVALCANTE JÚNIOR; KLUM; MAIA, 2002). Dessa forma, células com o p53 mutado e/ou com a p53 inativa permanecem com seus genomas mutados e vivas (caso as mutações não alterem alguma via metabólica de forma letal), enquanto acumulam mutações excessivamente, resultando em clones de células geneticamente mutadas e com transformação neoplásica (CAVALCANTE JÚNIOR; KLUM; MAIA, 2002). O principal mecanismo oncogênico do gene E6 do HPV é precisamente a inativação da p53. A oncoproteína E6, sintetizada pela transcrição do gene homônimo, é ligada a p53 pela ação da proteína ligase E6-AP, resultando na ubiquitinação e rápida degradação da p53 (ZUR HAUSEN, 2000). Por sua vez, o gene do retinoblastoma (Rb), reconhecido como “governador do ciclo celular”, foi o primeiro gene supressor de tumor elucidado, descoberto ao se estudar o tipo de tumor que deu nome ao gene. O gene Rb regula o ponto de controle G1/S, mediante a proteína retinoblastoma (pRb), produto de sua transcrição. O pRb, em sua forma ativa hipofosforilada, atua através de sua ligação aos fatores de transcrição E2F, inibindo sua interação com outros fatores de transcrição e assim impedindo a transcrição da ciclina E, e também através do recrutamento de proteínas remodeladoras de cromatina. Estas enzimas são

capazes de modificar promotores responsivos a E2F, insensibilizando o DNA aos fatores de transcrição. A ação do complexo ciclina E/CDK2 é essencial para iniciar a replicação celular, dessa forma a expressão de ciclina E mediada pelos fatores de transcrição E2F é necessária, requerendo, portanto, que a pRb esteja em sua forma inativa hiperfosforilada, incapaz de se ligar a E2F (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). A pRb é o alvo da oncoproteína E7 do HPV, fosforilando pRb ao se ligarem e causando a liberação de E2F (ZUR HAUSEN, 2000).

Um dos métodos de diagnóstico para detecção e prevenção de câncer é a citologia oncológica, no qual pode-se identificar alterações celulares decorrentes da carcinogênese, portanto decorrentes do HPV, no entanto o exame não é específico para o vírus (BRINGHENTI *et al.*, 2010). Contudo existem métodos para a detecção específica do vírus, como é o caso da PCR (sigla em inglês para reação em cadeia da polimerase). Esse método amplifica segmentos de DNA de forma exponencial, produzindo milhares de cópias dos segmentos. A amplificação é realizada por DNA polimerases, enzimas capazes de polimerizar ácidos nucleicos a partir de nucleotídeos, pequenos fragmentos de DNA, e uma molécula longa de DNA e nucleotídeos. Os nucleotídeos são os monômeros dos quais os ácidos nucleicos consistem. Os pequenos fragmentos de DNA são chamados de “iniciadores” e são sequências de DNA capazes de hibridizar na região alvo do DNA que se deseja amplificar. A molécula longa de DNA é a sequência de DNA que se quer amplificar, e o propósito dela na PCR é ser o modelo que a DNA polimerase irá copiar (JOSHI; DESHPANDE, 2010).

A técnica de PCR envolve três processos principais chamados desnaturação, anelamento e extensão. Primeiramente ocorre a desnaturação, processo no qual o DNA é desnaturado a uma temperatura entre 90 e 97 °C para que sua estrutura de dupla-hélice seja separada em duas fitas simples, permitindo que uma DNA polimerase se ligue com cada fita simples. Em seguida ocorre o anelamento, processo no qual o iniciador se anela à fita simples modelo de DNA a uma temperatura entre 50 e 60 °C. Por fim ocorre a extensão, processo no qual a DNA polimerase adiciona os nucleotídeos aos iniciadores a uma temperatura de cerca de 72 °C, sintetizando uma fita de DNA idêntica a fita modelo (JOSHI; DESHPANDE, 2010).

Para a identificação do HPV, iniciadores da região L do genoma do vírus são utilizados (BRINGHENTI *et al.*, 2010), pois amplificam região L1 que é usada para a classificação e construção de árvores filogenéticas, em razão de sua conservação entre diferentes HPVs (CAVALCANTE *et al.*, 2018). A região intergênica E6-E7, semelhantemente a região L1, também permite a identificação dos diferentes tipos de HPV (LETO *et al.*, 2011). Com o produto de PCR, é possível realizar uma PCR múltipla de tipagem, utilizando-se

misturas de iniciadores específicos de genótipos de baixo ou alto risco oncogênico (CAVALCANTE *et al.*, 2018).

A busca por uma etiologia viral para o câncer de mama humano continua a gerar certa discussão, visto que há a necessidade de comprovar a carcinogênese viral (MANT *et al.*, 2004; LAWSON; GÜNZBURG; WHITAKER, 2006; MALHONE; LONGATTO; FILASSI, 2018). Em estudo recente conduzido em Fortaleza, Brasil, foi encontrada a associação deste vírus ao câncer de mama e apontada como um problema de saúde pública mundial (CAVALCANTE *et al.*, 2018). Dessa forma, o presente estudo visou identificar o DNA de HPV e tipificá-los, relacionando com faixas de idades das pacientes e os tipos de amostras mamárias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a positividade do HPV em amostras mamárias e compreender sua frequência relacionada ao tipo de amostra e à idade das pacientes.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de HPV nas participantes do estudo;
- Identificar a frequência do HPV nas diferentes amostras mamárias;
- Verificar a ocorrência dos HPV's tipos 6/11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 56, 58 e 59;
- Relacionar a presença do HPV e o câncer de mama com a variável demográfica das participantes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

O estudo foi realizado nas instituições abaixo discriminadas:

- Grupo de Educação e Estudos Oncológicos – GEEON da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE);
- Laboratório de Pesquisa em Micobactérias do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-CE).

3.2 Tipo e período do estudo

O estudo é do tipo transversal, prospectivo e observacional. As coletas das amostras ocorreram no período de 2 de janeiro de 2019 a 30 de junho de 2019.

3.3 População do estudo

Foram inclusas no estudo participantes do sexo feminino com suspeita de lesão por HPV. As participantes foram atendidas no Grupo de Educação e Estudos Oncológicos (GEEON) da UFC, onde foram coletadas as amostras representativas do sítio de infecção (mamárias). Após a coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C até o transporte ao laboratório.

Os grupos de faixa etária utilizados nesse estudo foram três: com menos de 42 anos de idade, entre 42 e 51 anos de idade e com mais de 51 anos de idade. A idade 40 anos corresponde ao parâmetro adotado por mastologistas quanto ao início da triagem mamária em mulheres, e 51 anos de idade corresponde à média de idade da ocorrência da menopausa no Brasil. Tais parâmetros foram escolhidos por esses motivos (CAVALCANTE *et al.*, 2018).

3.4 Critérios de escolha das amostras

As participantes apresentaram diagnóstico de câncer de mama confirmado por avaliação histopatológica e/ou foram submetidas a avaliação com mastologista.

3.5 Pré-tratamento das amostras

Primeiramente, as amostras recebidas foram registradas e mantidas congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da extração. No caso de amostras de biópsia, estas foram descongeladas, colocadas em placas de Petri estéreis e cortadas em pequenos fragmentos com uma lâmina de bisturi estéril, sendo então transferidos para microtubos estéreis de 1,5 mL (tipo Eppendorf) previamente identificados. Amostras líquidas ou de raspado não necessitaram passar por pré-tratamento e foram diretamente para a etapa a seguir de extração de ácidos nucleicos.

3.6 Extração de ácidos nucleicos

Foi empregado o PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen), seguindo o protocolo destinado a extração e purificação de DNA de tecidos de mamíferos. O protocolo seguido foi o seguinte: foi adicionado 180 μL de PureLink™ Genomic Digestion Buffer a cada amostra, e em seguida foi acrescentado 20 μL de Proteinase K (600 mAU/mL). As amostras foram levadas ao vórtex (Certomat) e depois incubadas em Thermo-shaker (VHD) a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 horas. Foi incluso em toda as extrações um “controle negativo da extração” que foi realizado com água destilada em substituição a amostra clínica.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm durante 3 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos estéreis. Então, foi adicionado às amostras 20 μL de RNase A, levando-as em seguida ao vórtex. Em seguida, foi adicionado 200 μL de PureLink™ Genomic Lysis / Binding Buffer às amostras, levando-as em seguida ao vórtex. Foi adicionado 200 μL de álcool etílico absoluto às amostras e foi repetido o vórtex. Depois, a mistura de cada amostra (incluindo precipitados) foi pipetado em colunas de sílica apoiadas em tubos coletores de 2 mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e os tubos coletores foram descartados, apoiando então as colunas em novos tubos coletores. Em seguida, foi adicionado 500 μL de Wash Buffer 1 às amostras e estas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto e descartado novamente os tubos coletores. Então, 500 μL de Wash Buffer 2 foi adicionado às amostras e estas foram centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos e descartado o tubo coletor novamente. As colunas de sílica foram apoiadas em microtubos de 1,5 mL estéreis (com a tampa cortada) e 25 μL de PureLink™ Genomic Elution Buffer foi adicionado diretamente no centro das membranas das colunas. Depois, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas a 13.000 rpm por um 1 minuto. O processo de adição de 25 μL de PureLink™ Genomic Elution Buffer foi repetido e,

por fim, as colunas foram descartadas, e os microtubos com a solubilização final do DNA foram mantidos.

Finalmente, foi utilizado 2 μL de cada amostra para realizar a quantificação de DNA em nanoespectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e cada microtubo foi identificado com sua respectiva concentração de DNA. As amostras de DNA obtidas foram mantidas -20°C até o momento da PCR.

3.7 Detecção de HPV por PCR

A partir do DNA purificado, foi realizada a reação de PCR para a região genômica E6-E7. Para isso, em uma câmara de fluxo laminar, foi preparada uma mistura dos iniciadores GP-E6-3F, GP-E7-5B e GP-E7-6B (SOTLAR *et al.*, 2004), na concentração final de 50 pmol.

Foram preparados os *mixes* para a reação num microtubo tipo Eppendorf estéril e, em seguida, a quantidade calculada foi pipetada em frascos de 0,2 mL estéreis. A Tabela 1 apresenta as quantidades padrões dos componentes que foram usados para a preparação do *mix*.

Tabela 1 – Volumes dos componentes do *mix* para a PCR E6E7 do HPV

Componente do <i>mix</i>	Volume (μL)
Go Taq Green Master <i>Mix</i> M712C PROMEGA	12,5
Mistura de iniciadores GP-E6-3F/5B/6B, 50 pmol, final 0.1-1.0 μM (0,5 pmol)	0,25
Amostra DNA paciente (Controle positivo: 100 ng/ μL)	2 (Controle positivo)
Água livre de RNase	10,25
Volume final	25

Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar dos volumes serem padrões, as quantidades de DNA e água são variáveis para cada amostra, sendo os valores da tabela apenas para o controle positivo. Para as amostras, a quantidade total de DNA foi de 200 ng/ μL ou próximo, alterando a quantidade de água conforme fosse preciso, mas estando atento para que a quantidade de água fosse suficiente para uma homogeneização adequada dos componentes. Após a distribuição do *mix* nos frascos de 0,2 mL, as respectivas quantidades de DNA de cada amostra foram pipetadas nos tubos. Finalmente, as amostras foram levadas para o Termociclador GenePro (Bioer) para realizar a amplificação do DNA. A programação utilizada para realizar a amplificação está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Programa do termociclador para a amplificação da PCR E6-E7

Processo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	4 min.	1
Desnaturação	94 °C	1 min.	40
Anelamento	40 °C	1 min.	40
Extensão	72 °C	2 min.	40
Extensão final	72 °C	10 min.	1
Final da reação	4 °C	∞	-

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

Para se analisar o resultado da PCR E6-E7, 10 µL do produto de amplificação foi separado por corrida eletroforética durante cerca de 55 minutos a 90 volts em gel de agarose a 1,5% contendo 2,5 µL de solução de brometo de etídio 10 mg/mL. A cuba de eletroforese continha 350 mL de tampão TBE 1×. Além dos produtos de amplificação, 5 µL de marcador de 100 pb (Sinapse Inc.) também foram adicionados na corrida eletroforética.

Em seguida, para se identificar os tipos de HPV, foi realizada uma PCR a partir do produto da PCR E6-E7 (em substituição à amostra de DNA), em reação tipo nested-PCR, utilizada para realizar a tipagem das amostras. Inicialmente, novamente na câmara de fluxo laminar, foram preparadas duas misturas de iniciadores (Integrated DNA Technologies, Inc., USA), *Mixes* HPV I e II, na concentração de 2 pmol cada. O *Mix* HPV I foi composto pelos iniciadores 16, 18, 31, 45 e 59, enquanto que o *Mix* HPV II foi composto pelos iniciadores 6/11, 33, 52, 56 e 58 (SOTLAR *et al.*, 2004).

Em seguida, foram preparados dois *mixes* para duas reações de Nested-PCR (cada reação referente a uma mistura de iniciadores específicos para a tipificação – *Mixes* HPV I e II) em microtubo tipo Eppendorf estéril para, em seguida, a quantidade calculada ser pipetada em frascos de 0,2 mL estéreis. A Tabela 3 apresenta as quantidades padrões dos componentes que foram usados para a preparação dos *mixes* de Nested-PCR.

Tabela 3 – Componentes dos *mixes* para a PCR Tipagem do HPV

Componentes dos <i>mixes</i>	Volume (µL)
Go Taq Green Master Mix M712C PROMEGA	12,5
10x <i>Mix</i> HPV I ou II (2 pmol)	2,5
2 µL do produto E6E7	2,0
Água livre de RNase	8
Volume Final	25

Fonte: elaborado pelo autor.

Os *mixes*-PCR das tipagens foram amplificados em termociclador, sendo utilizado o programa apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Programa do termociclador para a amplificação da PCR Tipagem

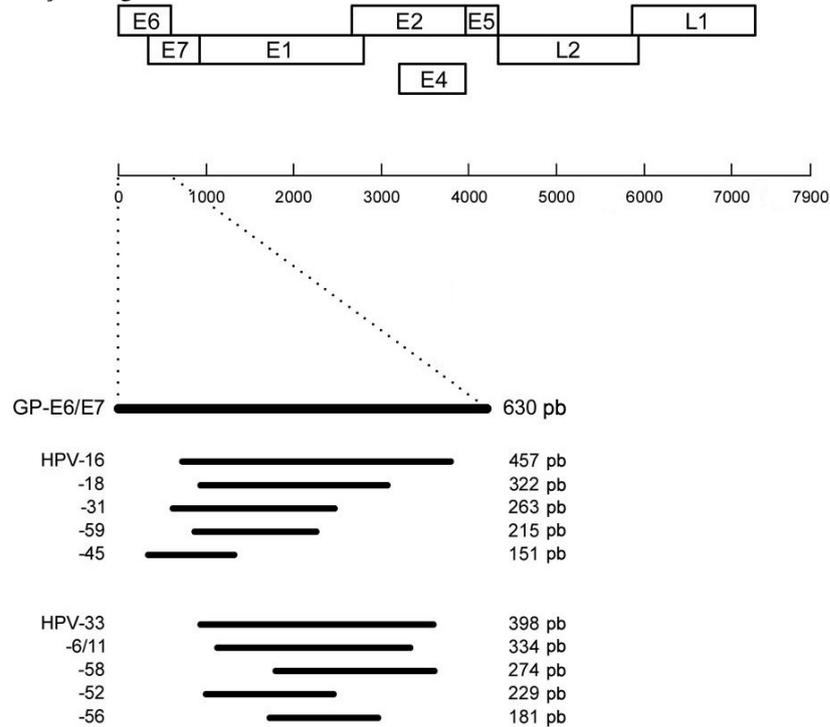
HPV Mix Tipagem	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94 °C	4 min.	1
Desnaturação	94 °C	30 s	35
Anelamento	56 °C	30 s	35
Extensão	72 °C	45 s	35
Extensão final	72 °C	4 min.	1
Final da reação	4 °C	∞	-

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

Para a análise da PCR Tipagem, 10 µL do produto da PCR foi separado por corrida eletroforética durante cerca de 1 hora e 5 minutos a 90 volts em gel de agarose a 2%, contendo 2,5 µL de solução de brometo de etídio 10 mg/mL. A cuba de eletroforese continha 350 mL de tampão TBE 1×. Além dos produtos da amplificação, 5 µL de marcador de 50 pb (Invitrogen) foram adicionados na corrida eletroforética.

Por fim, após as corridas eletroforéticas, os géis de agarose foram revelados em transiluminador (ImageQuant 300) e os produtos nos géis foram analisados por comparação de seus pesos moleculares. A região intergênica E6-E7 e os genes de cada tipo de HPV apresentam os seguintes pesos moleculares específicos: E6-E7 (592 a 672 pb), *Mix 1*: HPV 16 (457 pb), HPV 18 (322 pb), HPV 31 (263 pb), HPV 59 (215 pb) e HPV 45 (151 pb). *Mix 2*: HPV 33 (398 pb), HPV 6/11 (334 pb), HPV 58 (274 pb), HPV 52 (229 pb), HPV 56 (181 pb) (SOTLAR *et al.*, 2004). A variação de peso molecular do produto de amplificação da PCR E6-E7 ocorre devido às variações na sequência intergênica entre os tipos de HPV. A Figura 2 apresenta um diagrama das posições dos produtos de amplificação relacionados ao genoma do HPV.

Figura 2 – Diagrama das posições dos produtos de amplificação das PCRs em relação ao genoma do HPV 16



Fonte: adaptado de Sotlar *et al.* (2012). O diagrama indica a posição do genoma do HPV (16) que é amplificada ao se utilizar os iniciadores específicos para a região intergênica E6-E7, bem como as posições dos produtos da PCR de tipificação dentro da região E6-E7 e seus respectivos pesos moleculares em pares de bases.

3.8 Interpretação dos resultados

Os resultados das PCRs da região E6-E7 possuem os resultados como positivo ou negativo, enquanto os resultados das PCRs Tipagem possuem os resultados como negativo ou o tipo de HPV.

As amostras e os marcadores que sofreram a corrida eletroforética são mostrados em bandas coradas que são visualizados após a revelação em luz ultravioleta. Cada banda representa as sequências de DNA que possuem o mesmo peso molecular e são dispostas em colunas, ordenadas das que possuem maior peso molecular para as que possuem menor peso molecular (em pares de base), de cima para baixo. No caso dos marcadores, as bandas possuem pesos moleculares que formam a sequência de intervalos que o marcador representa (de 50 em 50 pb, de 100 em 100 pb). Em cada gel há duas colunas com marcadores, a primeira e a última.

3.9 Considerações éticas

O projeto de pesquisa, como todo o protocolo experimental, foi submetido a Plataforma Brasil sistema CEP/CONEP, sendo aprovado com o Número do Parecer: 2.396.348 no dia 23 de novembro de 2017 (ANEXO A).

Todos os participantes do estudo foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) e a responder o questionário contendo informações demográficas, comportamentais, clínicas e laboratoriais. O coordenador geral do projeto foi responsável por obter aprovação do Protocolo de Estudo pelo Comitê de Ética. O Estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e as revisões de Tóquio (1975), Veneza (1983), Hong Kong (1989), Somerset Oeste (1996) e Edinburgh (2000), assim como as regulamentações locais (resolução nº 466, de 12/12/2012 e complementares do CNS-MS, bem como Resolução 10/01 da ANVISA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos géis

Nas Fotografias 1, 2 e 3 são apresentados géis com produtos de PCR das amostras mamárias analisadas e seus respectivos controles positivos e negativos. A Fotografia 1 apresenta positividade ao HPV pela amplificação da região E6-E7. A Fotografia 2 apresenta positividade ao *Mix 1*, com amostras positivas para o HPV 16. A Fotografia 3 apresenta positividade ao *Mix 2*, com amostras positivas para o HPV 6/11.

Fotografia 1 – Amplificação de amostras mamárias com os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B para a região intergênica E6-E7 do HPV



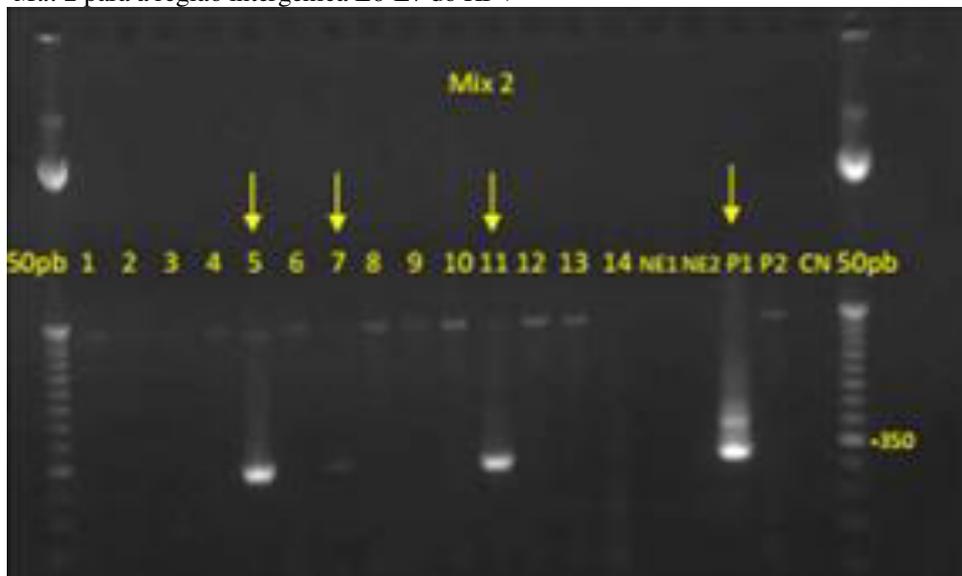
Fonte: elaborado pelo autor. Gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região E6-E7 do HPV com os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B (produto de 592 a 672 pb). Poço 100pb: Marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse Inc.); poços 1 a 8 e 10 a 18: amostras com ausência de produto para os iniciadores GP-E6-3F/5B/6B; poço 9: amostra positiva para GP-E6-3F/5B/6B exibindo produto de 600 pb; poços NE1 e NE2: controle negativo da extração (H₂O substituindo DNA); poço CN: controle negativo da reação de PCR (H₂O substituindo DNA); poço P1 e P2: controles positivos (banda de 600 pb) com amostra de condiloma vaginal.

Fotografia 2 – Amplificação de amostras mamárias com os iniciadores tipo-específicos *Mix 1* para a região intergênica E6-E7 do HPV



Fonte: elaborado pelo autor. Gel de agarose 2% em tampão TBE 1× de produtos de amplificação da região E6-E7 do HPV com os iniciadores *Mix 1*, HPV 16 (457 pb), 18 (322 pb), 31 (263 pb), 59 (215 pb), 45 (151 pb). Poço 50pb: Marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen); poços 1 a 7 e 9 a 18: amostras com ausência de produto para os iniciadores do *Mix 1*; poço 8: amostra positiva para *Mix 1* exibindo produto de 457 pb (HPV 16); poços NE1 e NE2: controles negativos da extração (H₂O substituindo DNA); poço CN: controle negativo da reação de PCR (H₂O substituindo DNA); poços P1 e P2: controles positivos (banda de 457 pb, HPV 16) com amostra de condiloma vaginal.

Fotografia 3 – Amplificação de amostras mamárias com os iniciadores tipo-específicos *Mix 2* para a região intergênica E6-E7 do HPV



Fonte: elaborado pelo autor. 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). Poço 50pb: Marcador de peso molecular de 50 pb (Invitrogen); poços 1 a 4, 6 a 10 e 12 a 14: amostras com ausência de produto para os iniciadores *Mix 2*; poços 5, 7 e 11: amostras positivas para *Mix 2* exibindo produtos de 334 pb (HPV 6/11); poços NE1 e NE2: controles negativos da extração (H₂O substituindo DNA); poço CN: controle negativo da reação de PCR (H₂O substituindo DNA); poços P1 e P2: controles positivos: controle positivo (bandas de 334 e 398 pb, HPV 6/11 e 33) com amostra de condiloma vaginal.

4.2 Frequência de HPV nas amostras de estudo

Das 79 amostras que foram analisadas, nenhuma apresentou positividade para a região genômica E6/E7 e 16 (20,3%) foram positivas na tipagem do HPV (TABELA 5).

Em relação às diferentes amostras mamárias, as seguintes positivities foram encontradas para a tipagem: 6 (7,6%) amostras em biópsia e 10 (12,7%) amostras ductais.

Tabela 5 – Compilação do número amostral, frequência de positividade da PCR para a região E6-E7 e para a tipagem, para as amostras totais, em biópsia e ductais

Amostras	Total, N	Positividade	
		E6-E7 N (%)	Tipagem N (%)
Biópsias	44	0	6 (7,6)
Ductais	35	0	10 (12,7)
Total	79	0	16 (20,3)

4.3 Frequência dos tipos de HPV em diferentes tipos de amostras

Dentre as 16 amostras positivas para a tipagem, 13 (81,3%) apresentaram positividade para o HPV 6/11, duas (12,5%) para o HPV 16 e apenas uma (6,3%) para o HPV 33 (TABELA 6).

Em relação as amostras em biópsia, 5 apresentaram positividade para HPV 6/11 e uma para HPV 16. Enquanto em relação as amostras ductais, 8 apresentaram positividade para HPV 6/11, uma para HPV 16 e outra para HPV 33.

Tabela 6 – Frequência dos tipos de HPV identificados nas amostras em biópsia e ductais

Amostras	Tipagem, N	Positividade		
		HPV 6/11 N (%)	HPV 16 N (%)	HPV 33 N (%)
Biópsias	6	5 (31,3)	1 (6,3)	0
Ductais	10	8 (50,0)	1 (6,3)	1 (6,3)
Total	16	13 (81,3)	2 (12,5)	1 (6,3)

4.4 Relação do HPV e do câncer de mama com a variável demográfica

As 79 amostras analisadas no estudo foram coletadas de 32 pacientes. Dessas, cinco apresentaram diagnóstico positivo para câncer de mama, sendo duas com menos de 42 anos de idade e três com idade entre 42 e 51 anos (TABELA 7).

Tabela 7 – Frequência dos tipos de HPV identificados em grupos de faixas etárias que apresentaram ou não câncer de mama

Faixa etária (anos)	Neoplasia	HPV, N (%)				
		Total	HPV 6/11	HPV 16	HPV 33	Negativo
< 42 N=4	Com câncer de mama	2 (6,1)	1 (3,0)	0	0	1 (3,0)
	Sem informação de neoplasia	2 (6,1)	1 (3,0)	0	0	1 (3,0)
42-51 N=4	Com câncer de mama	3 (9,1)	1 (3,0)	2 (6,1)	0	0
	Sem informação de neoplasia	1 (3,0)	0	0	0	1 (3,0)
51 > N=2	Com câncer de mama	0	0	0	0	0
	Sem informação de neoplasia	2 (6,1)	2 (6,1)	0	0	0
Total N=10	Com câncer de mama	5 (15,2)	2 (6,1)	2 (6,1)	0	1 (3,0)
	Sem informação de neoplasia	5 (15,2)	3 (9,1)	0	0	2 (6,1)
Sem registro de idade N=22	Sem informação de neoplasia	22 (66,7)	5 (15,2)	0	1 (3,0)	16 (48,5)

Entre as duas pacientes com menos de 42 anos de idade, uma apresentou positividade para HPV 6/11 em uma de suas amostras analisadas, enquanto a outra apresentou resultado negativo para HPV em suas amostras analisadas.

Já em relação às três pacientes com idade entre 42 e 51 anos, uma apresentou positividade para HPV 6/11 em uma de suas amostras analisadas, e as outras duas apresentaram positividade para HPV 16 em uma de suas amostras analisadas cada.

O restante das pacientes do estudo, totalizando 27, não apresentaram registro de diagnóstico para câncer de mama. Duas com menos de 42 anos de idade, uma com idade entre 42 e 51 anos, duas com mais de 51 anos de idade, e 22 não apresentaram registro de idade.

Entre as duas pacientes com menos de 42 anos de idade, uma apresentou positividade para HPV 6/11 em uma de suas amostras analisadas, enquanto a outra apresentou resultado negativo para HPV. A paciente com idade entre 42 e 51 anos apresentou resultado negativo para HPV em suas amostras analisadas. Em relação às duas pacientes com mais de 51 anos de idade, ambas apresentaram positividade para HPV 6/11 em no mínimo uma de suas amostras analisadas cada. E dentre as 22 pacientes sem registro de idade, cinco apresentaram

positividade para HPV 6/11, uma apresentou positividade para HPV 33 e 16 pacientes apresentaram resultado negativo para HPV em suas amostras.

5 DISCUSSÃO

A maior positividade da tipagem em relação a região E6-E7 é justificada pelo ensaio ocorrer em reação de nested-PCR. Na PCR convencional, ocorre a amplificação exponencial de uma sequência de DNA alvo, chamada amplicon. Na nested-PCR, então, ocorre a amplificação exponencial de uma outra sequência de DNA, contida no amplicon que sofreu a primeira PCR. Dessa forma, a sensibilidade da detecção molecular é aumentada, em razão da ampliação do número de cópias do fragmento de DNA alvo. Além disso, a especificidade do diagnóstico molecular aumenta, pois, a amplificação da sequência interna do amplicon inicial depende das complementaridades entre os pares de iniciadores e das sequências de DNA nas duas etapas que consistem na nested-PCR.

A maior frequência de positividade da tipagem em amostras ductais foi um resultado inesperado, visto que os métodos de coleta de amostras ductais obtêm menor quantidade de células em comparação com os métodos de coleta de amostras em biópsias. Contudo, hipotetizamos que o ducto mamário seria a porta de entrada para o vírus, via transmissão oro-mamária, deste modo corroborando com a elevada positividade.

A maior prevalência do HPV 6/11 em relação aos tipos 16 e 33 é justificada pelos tipos 6 e 11 serem os mais comuns em verrugas genitais (BRASIL, 2014) e em mucosas orais (OLIVEIRA *et al.*, 2003), o que contribui com a corroboração da hipótese da transmissão oro-mamária.

Neste estudo, 39,4% (13/32) das pacientes apresentaram positividade para HPV, sendo 12,1% de pacientes com câncer de mama (carcinomas invasivos) e 27,3% de pacientes sem informação de neoplasia. Tais amostras apresentaram resultado positivo apenas para os primers específicos para HPV 6/11, 16 e 33, dentre os dez utilizados na tipagem. Ao comparar esses dados obtidos com os resultados de diversos estudos semelhantes publicados, é possível observar que são destoantes. Yu *et al.* (2000) relataram positividade de HPV 33 em 43,8% das amostras com câncer de mama invasivo que analisaram de uma população chinesa, além de não terem detectado HPV 16 e 18. Lindel *et al.* (2007) relataram que dentre 81 pacientes suíças com câncer de mama analisadas, nenhuma apresentou positividade para a região L1 de HPV. de Cremoux *et al.* (2008) relataram não terem encontrado positividade para HPV em nenhuma das 50 amostras de carcinomas mamários na pesquisa para HPV 16, 18, 33, 45, 6 e 11. Kan *et al.* (2005) relataram positividade para HPV 18 em 48% de amostras de câncer de mama invasivo ductal de pacientes australianas caucasianas. Damin *et al.* (2004) relataram positividade para HPV 16 e 18 em 24,8% de amostras de carcinomas mamários in situ. Kroupis *et al.* (2006)

relataram positividade para 21 tipos de HPV, principalmente HPV 16, 59 e 58, em 15,9% de amostras de câncer de mama. Esse valor, no entanto, é referente a apenas 17 amostras, o que consiste em amostras de coinfeções duplas ou mesmo triplas. de Villiers *et al.* (2005) relataram positividade para diversos tipos de HPV em amostras de carcinomas mamários (86%) e seus respectivos mamilos (69%), sendo os HPV 6 e 11 os mais prevalentes em ambos tipos de amostras. Hennig *et al.* (1999) demonstraram positividade para HPV 16 em 46% de amostras de carcinomas mamários provenientes de pacientes com histórico de HPV 16 em neoplasias intra-epiteliais cervicais de grau III. de León *et al.* (2009) relataram positividade para HPV 16 e 18 em 29,4% de amostra de câncer de mama de pacientes mexicanas. Widschwendter *et al.* (2004) relataram positividade para HPV em 45,4% de amostras de câncer de mama provenientes de pacientes com histórico de câncer cervical invasivo. Também relataram positividade para HPV em 9,1% de amostra de câncer de mama provenientes de pacientes sem histórico de câncer cervical, definidas como grupo controle.

Como apontado por Hennig *et al.* em 1999 e por Yu *et al.* em 2000, a possível correlação entre HPV e a carcinogênese mamária permanece incerta, visto que a frequência de positividade para HPV variou de 0 a 86% dentre os estudos apresentados e os tipos de HPV encontrados também não foram constantes. Porém, apesar de serem semelhantes, tais estudos possuíram populações de estudo distintas (DE CREMOUX *et al.*, 2008), assim como as etnias das pacientes também diferem entre cada população de estudo (KAN *et al.*, 2005). Lindel *et al.* (2007) salientaram a importância da realização de novos estudos epidemiológicos, devido a importância de fatores como país de origem e histórico de HPV, principalmente levando em consideração que a América Latina e a Ásia possuem uma incidência de infecção por HPV maior que a Europa e os Estados Unidos. Além disso, Lindel *et al.* (2007) também notabilizam que as diferenças taxas de infecção por HPV em cânceres de mama podem ser justificadas por diversas características demográficas, como desnutrição, alta fertilidade e falta de acesso a assistência médica e de saúde.

No presente trabalho, dentre as pacientes HPV positivas que apresentaram câncer de mama, 25% possuía idade inferior a 42 anos, enquanto 75% possuía entre 42 e 51 anos de idade. No estudo realizado por Yu *et al.* (2000), 35,7% das pacientes com positividade para HPV possuía idade inferior a 50 anos, enquanto 64,3% das pacientes com positividade para HPV possuía idade superior a 50 anos. No estudo de Lindel *et al.* (2007), todas as pacientes, com idades inferiores e superiores a 50 anos, apresentaram resultado negativo para HPV. No estudo de de Cremoux *et al.* (2008), todas as pacientes, com idades inferiores e superiores a 50 anos, apresentaram resultado negativo para HPV. No estudo de Damin *et al.* (2004), as

pacientes HPV positivas possuíam idade média de 56 anos (45–67). No estudo de Kroupis *et al.* (2006), as pacientes HPV positivas possuíam idade média de 38 anos (35–51).

Apesar dos resultados controversos, dentre os estudos citados, a maioria das pacientes com câncer de mama HPV positivas possuíam idade similar, próxima, ou superior a 50 anos. Além disso, os resultados estão em discordância com Rousseau *et al.* (2000) que publicaram que a idade como fator de risco para infecção por HPV decresce à medida que a idade aumenta. Também apontaram que essa relação benigna entre idade avançada e infecção por HPVs de alto risco oncogênico não foi testemunhada entre idade avançada e infecção por HPVs de baixo risco oncogênico, o que poderia significar que HPVs de diferentes riscos oncogênicos apresentam diferenças em relação a fatores como resposta imunológica e transmissão.

Não obstante os métodos e resultados do presente estudo estarem em conformidade com outros estudos semelhantes, o uso de técnicas complementares poderia reduzir a possibilidade de resultados falso-negativos ou falso-positivos. O emprego de técnicas de dot blot ou de hibridização reduziriam a possibilidade de falsos-negativos, enquanto o sequenciamento dos produtos da PCR descartaria a possibilidade de falsos-positivos (DAMIN *et al.*, 2004).

Apesar do foco das pesquisas atuais ser a verificação da relação do câncer de mama com HPV, a análise de amostras sem neoplasia se faz pertinente, pois a presença de HPV nessas amostras certamente apresenta um risco carcinogênico e, portanto, a presença ou não de neoplasias pode se revelar apenas uma questão de tempo. Assim, esses dados apresentarão maior significância se estudados em grupos de pacientes com e sem histórico de HPV em neoplasias cervicais e comparados, em estudos tipo caso-controle.

São duas as vacinas profiláticas aprovadas e regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (Anvisa). A quadrivalente previne infecções pelos HPVs tipo 6, 11, 16 e 18 (*Gardasil*[®] vaccine Merck, Whitehouse Station NJ USA). A bivalente previne contra os tipos 16 e 18 (*Cervarix*[®] vaccine GlaxoSmithKline, Rixensart, Belgium), mas também já se mostrou eficaz contra infecções para os tipos não-vacinais 31, 33 e 45 (ZARDO *et al.*, 2014). E em 2015 foi estabelecida na Europa e Estados Unidos a vacina contra HPV do tipo novevalent, contra os tipos 6-11-16-18-31-33-45-52-58 (*Gardasil-9*[®] vaccine Merck, Whitehouse Station NJ USA) (SIGNORELLI *et al.*, 2017). É pressuposto que a prevenção concebida por tais vacinas se estenda também para outros tipos de câncer – e para outros tipos de HPV –, não apenas o câncer cervical, com eficácia moderada a alta (ZARDO *et al.*, 2014), estabelecendo uma resposta imune protetora cruzada (EINSTEIN *et al.*, 2011). Assim sendo,

mesmo a relação entre HPV e a carcinogênese mamária permanecendo controversa, a vacina contra HPV se mostraria útil, visto que parte dos casos de câncer de mama parece ter o vírus como agente etiológico. Além disso, caso a correlação HPV e carcinogênese mamária seja confirmada, a vacina contra HPV e a realização de sua ampla cobertura vacinal se tornariam ainda mais relevantes.

6 CONCLUSÃO

A frequência de HPV nas amostras analisadas foi maior nas amostras ductais, sendo os tipos mais frequentes o HPV 6/11, de baixa oncogenicidade, seguido do HPV 16 e 33, ambos de alta oncogenicidade.

Com as informações obtidas, o diagnóstico positivo para HPV em paciente com câncer de mama, teve maior frequência em pacientes com idade entre 42 e 51 anos.

Foi possível determinar a positividade do HPV nas amostras biológicas mamárias propostas. No entanto, os dados obtidos se mostraram insuficientes para uma compreensão mais acertada da relação da frequência com a idade das pacientes, e sua relação com os tipos de amostras se mostrou o oposto do esperado.

REFERÊNCIAS

BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN Z.; VAN DOORSLAER K.; ZUR HAUSEN H.; DE VILLIERS E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-79, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia prático sobre o HPV. Brasília, 2014. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/campanhas/2014/hpv/Guia_perguntas_e_repostas_MS_HPV_profissionais_de_saude.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2017.

BRINGHENTI, M. E. Z.; DOZZA, T. G.; DOZZA, T. G.; MARTINS, T. R.; BAZZO, M. L. Prevenção do câncer cervical: associação da citologia oncológica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do papilomavírus humano (HPV). **DST – Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis**, Rio de Janeiro, 2010.

CAVALCANTE JÚNIOR, G. B.; KLUMB, C. E.; MAIA, R. C. p53 e as hemopatias malignas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 419-27, 2002.

CAVALCANTE, J. R.; PINHEIRO, L. G. P.; ALMEIDA, P. R. C.; FERREIRA, M. V. P.; CRUZ, G. A.; CAMPELO, T. A.; SILVA, C. S.; LIMA, L. N. G. C. L.; OLIVEIRA, B. M. K.; LIMA, L. M.; FEITOSA, L. M. C.; PINHEIRO, A. C.; FROTA, C. C. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. **Clinics**, v. 73, n. e465, 2018.

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, 2004.

DE CREMOUX, P.; THIOUX, M.; LEBIGOT, I.; SIGAL-ZAFRANI, B.; SALMON, R.; SASTRE-GARAU, X. No evidence of Human papillomavirus DNA sequences in invasive breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 109, 2008.

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 in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 1, 2005.

EINSTEIN, M. H.; BARON, M.; LEVIN, M. J.; CHATTERJEE, A.; FOX, B.; SCHOLAR, S.; ROSEN, J.; CHAKHTOURA, N.; LEBACQ, M.; VAN DER MOST, R.; MORIS, P.; GIANNINI, S. L.; SCHUIND, A.; DATTA, S. K.; DESCAMPS, D. Comparison of the immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 vaccine and the HPV-6/11/16/18 vaccine for oncogenic non-vaccine types HPV-31 and HPV-45 in healthy women aged 18–45 years. **Human Vaccines**, v. 7, n. 12, p. 1359-1373, 2011.

- 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, 1999.
- JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. **International Journal of Biomedical Research**, v. 1, n. 5, 2010.
- 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, 2005.
- 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, 2006.
- KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.
- LAWSON, J. S.; GÜNZBURG, W. H.; WHITAKER, N. J. Viruses and human breast cancer. **Future Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 33-51, 2006.
- 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, n. 1, 2018.
- LETO, M. G. P.; SANTOS JÚNIOR, G. F.; PORRO, A. M.; TOMIMORI, J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, 2011.
- LINDEL, K.; FORSTER, A.; ALTERMATT, H. J.; GREINER, R.; GRUBER, G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: No evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. **The Breast**, v. 16, 2007.
- MALHONE, C.; LONGATTO, A.; FILASSI, J. R. Is human papilloma virus associated with breast cancer? A review of the molecular evidence. **Acta Cytologica**, v. 62, p. 166-177, 2018.
- MANT, C.; HODGSON, S.; HOBDDAY, R.; D'ARRIGO, C.; CASON, J. A Viral Aetiology for Breast Cancer: Time to Re-Examine the Postulate. **Intervirolgy**, v. 47, p. 2-13, 2004.
- OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; PINTO, L. P.; COSTA, A. L. L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 4, p. 553-559, 2003.
- ROUSSEAU, M.-C.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; TERMINI, L.; PRADO, J. M.; ROHAN, T. E. A Cumulative Case-Control Study of Risk Factor Profiles for Oncogenic and Nononcogenic Cervical Human Papillomavirus Infections. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 469-476, 2000.
- RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O. Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalência do

HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 123-130, 2008.

SIGNORELLI, C.; ODONE, A.; CIORBA, V.; CELLA, P.; AUDISIO, R. A.; LOMBARDI, A.; MARIANI, L.; MENNINI, F. S.; PECORELLI, S.; REZZA, G.; ZUCCOTTI, G. V.; PERACINO, A. Human papillomavirus 9-valent vaccine for cancer prevention: a systematic review of the available evidence. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 10, p. 1962-1982, 2017.

SOTLAR, K.; DIEMER, D.; DETHLEFFS, A.; HACK, Y.; STUBNER, A.; VOLLMER, N.; MENTON, S.; MENTON, M.; DIETZ, K.; WALLWIENER, D.; KANDOLF, R.; BÜLTMANN, B. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 3176-3184, 2004.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

STANLEY, M. A. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 215-222, 2012.

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.

YU, Y.; MORIMOTO, T.; SASA, M.; OKAZAKI, K.; HARADA, Y.; FUJIWARA, T.; IRIE, Y.; TAKAHASHI, E.; TANIGAMI, A.; IZUMI, K. Human Papillomavirus Type 33 DNA in Breast Cancer in Chinese. **Breast Cancer**, v. 7, n. 1, 2000.

ZARDO, G. P.; FARAH, F. P.; MENDES, F. G.; FRANCO, C. A. G. S.; MOLINA, G. V. M.; MELO, G. N.; KUSMA, S. Z. Vacina como agente de imunização contra o HPV. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 9, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 9, p. 690-698, 2000.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da Patogênese do Papiloma Vírus Humano (HPV) no Câncer de Mama

Pesquisador: Luiz Gonzaga Porto Pinheiro

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79596717.5.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Cirurgia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.396.348

Apresentação do Projeto:

Tipo de Estudo: Estudo Caso-Controlé Duração do Estudo: 24 meses.

Critérios de Inclusão Serão convidadas a participar do estudo mulheres na faixa etária de 30 a 50 anos. Os participantes preencherão um questionário dos dados demográficos, clínicos (incluindo ginecológicos), laboratoriais e comportamentais. Rotinas Diagnósticas nas Pacientes Portadoras de Câncer de Mama (Grupo Caso) Exame ginecológico, exame odontológico, exame clínico das mamas. Realização de mamografia, USG mamária e abdominal, radiografia panorâmica odontológica, cintilografia óssea e radiografia de tórax quando necessárias. Estudo anatomopatológico da lesão mamária com pesquisa de DNA-HPV em amostra e estudo imunohistoquímico (genes RE, RP, Cerb-2, P53 e P16). Será ainda obtido material de esfregaço de papila e, se presença de lesões papilares, poderá ser realizado ainda coleta de material da papila para histopatológico. Rotinas Diagnósticas nas Pacientes com Mamas Normais (Grupo Controle) Exame ginecológico, exame odontológico com execução de radiografia panorâmica e exame clínico das mamas. Mamografia para todas as pacientes e ultrassonografia mamária em casos selecionados. Será obtido esfregaço de papila para pesquisa de DNA-HPV em amostra. Coleta das amostras dos grupos Caso e coletadas no mínimo seis (06) amostras clínicas das pacientes do grupo caso, dos seguintes locais: 02 amostras de cavidade oral; 01 amostra da lesão tumoral; 01 amostra de escovado de papila; 02 amostras ginecológicas. Amostras extras poderão ser coletadas à dependência de lesões orais identificadas ao exame clínico, lesões cervicais identificadas à colposcopia ou lesões papilares suspeitas que exijam histopatológico.

Do grupo controle (pacientes com mamas normais), serão coletadas no mínimo cinco (05) amostras dos seguintes locais: 02 amostras em cavidade oral; 02 amostras ginecológicas; 01

amostra de escovado de papila. Amostras extras poderão ser coletadas à dependência de lesões orais identificadas ao exame clínico ou lesões cervicais identificadas à colposcopia (ou lesões papilares suspeitas que exijam histopatológico). Extração do DNA genômico e Detecção de HPV por PCR. O DNA de HPV será extraído das amostras de raspado da mucosa e/ou biopsia da lesão cavidade oral, sendo utilizado o DNeasyBlood&Tissue Kit (Qiagen). O DNA obtido será quantificado em espectrofotômetro Nanodrop e depois mantido a -20°C até o momento da PCR. A detecção do HPV será realizada por meio da técnica de nested PCR multiplex descrita por Sotlar *et al.* (2004), utilizando um conjunto de iniciadores que amplificam a região de consenso E6/E7 do HPV. Para isso, as amostras serão analisadas quanto à qualidade do DNA utilizando o padrão de amplificação do gene de proteína beta- globina por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR Multiplex). A sequência de 268pb será amplificada com iniciadores PC04 e GH20 (Saiki et al, 1986). Os produtos serão separados em gel de agarose a 2% pela técnica de eletroforese.

Critério de Inclusão:

Pacientes do sexo feminino na faixa etária de 30 a 50 anos. Critério de Exclusão:

Serão excluídas do estudo as pacientes que se negaram a responder o questionário, previamente vacinadas contra o HPV e que tenham realizado tratamento prévio do câncer de mama (cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia), câncer oral ou cabeça e pescoço (cirurgia e/ou radioterapia) ou câncer de colo de útero (cirurgia e/ou radioterapia).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar a participação do Papiloma Vírus Humano (HPV) na patogênese do Câncer de Mama em pacientes diagnosticadas no Grupo de Educação e Estudos Oncológicos (GEEON), buscando elucidar a provável via de contaminação da Mama.

Objetivo Secundário:

Relacionar os dados demográficos, clínicos, laboratórios e comportamentais com a frequência e os tipos de HPV nos grupos estudados;

Caracterizar e comparar por técnicas de genotipagem (técnica de PCR multiplex) as cepas de HPV presentes nas amostras (oral, genital e de mama) de pacientes com e sem câncer de mama;

Estudar a correlação entre o HPV identificado na Mama e o HPV presente em cavidades orais e na genitália feminina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco psicológico em caso de possível diagnóstico de cânceres de mama e do colo uterino, de descoberta de lesões por HPV ou de genotipagem de cepas malignas do HPV. Nesses casos, pacientes serão encaminhadas ao Serviço de Psicologia existente na instituição.

Benefícios:

As atuais evidências entre a infecção pelo vírus do HPV e a fisiopatologia do câncer de mama levantam ainda questões de extrema importância para a Saúde Pública. O estudo da presença do HPV no tecido mamário e a sua correlação com as cepas de HPV detectadas em outras regiões anatômicas, como cavidade oral e genitália, é de extremo valor por permitir o entendimento da provável via de contaminação da papila mamária. A semelhança do que já é feito nas neoplasias de colo uterino este estudo poderá abrir novas perspectivas quanto à identificação de lesões mamárias induzidas pelo HPV, permitindo desenvolvimento de modelos de prevenção primária. Ressalta-se que os atuais modelos de prevenção primária de cânceres, em sua maioria, tiveram grande importância em redução de morbimortalidade específica, tempo perdido de vida e gastos públicos relacionados à assistência. Diante do exposto, fica patente a carência de melhores estudos sobre a história natural do câncer de mama e sua correlação com o HPV; a determinação da via de transmissão do HPV para as Mamas, que possibilite desenvolver técnicas para prevenção do câncer de mama relacionado a este vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e atende às normas nacionais e internacionais relativas à pesquisa com seres humanos, em especial a 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado, s.m.j desse C.E.P.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_934792.pdf	27/10/2017 17:32:16		Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_PESQUISADORES_MODELO_ASSINADO.pdf	27/10/2017 17:31:59	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.pdf	23/10/2017 19:29:48	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	23/10/2017 19:28:55	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	23/10/2017 19:27:55	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito
Outros	CARTA_APRECIACAO.PDF	23/10/2017 18:48:15	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_MODELO_ASSINADO.pdf	23/10/2017 18:47:36	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AUTORIZACAO_INSTITUCIONAL.PDF	23/10/2017 18:47:17	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_MODELO_ASSINADO.pdf	23/10/2017 18:47:00	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 23 de Novembro de 2017

Assinado por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA

(Coordenador)

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidada pelo pesquisador Luiz Gonzaga Porto Pinheiro como participante da pesquisa intitulada “Estudo da Patogênese do Papiloma Vírus Humano (HPV) no Câncer de Mama”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

A presente pesquisa pretende investigar o papel de um vírus transmitido sexualmente, o Papiloma Vírus Humano (HPV), no desenvolvimento do Câncer de Mama. Para tal, as participantes que concordarem com a participação na pesquisa realizarão **três consultas** junto à **Especialistas** do Serviço de Diagnóstico em Mastologia (SDM) Prof. Luiz Porto, sediado no Grupo de Educação e Estudos Oncológicos (GEEON), na Rua Papi Júnior, 1511 – Rodolfo Teófilo. A primeira junto a um Mastologista, que realizará a coleta de secreção dos mamilos (seios) com pequenas escovas. A segunda será com um Cirurgião Dentista, que também coletará amostra de secreção (saliva) das bochechas com espátulas, e a terceira com um Médico Ginecologista, que realizará um exame de preventivo, similar ao que é realizado no posto de Saúde. As amostras serão devidamente identificadas e armazenadas para estudo posterior em laboratório.

Os possíveis riscos da pesquisa incluem a eventual descoberta de um Câncer ou de uma infecção por doença sexualmente transmissível (já existente anteriormente e sem qualquer relação causal com a Pesquisa ou seus procedimentos), seja na Mama, no Colo do Útero ou no Boca, uma vez que é próprio da realização de consultas junto a profissionais de saúde e de exames ou testes laboratoriais a confirmação ou o afastamento de doenças. Outro ponto negativo incluirá o desconforto e constrangimento durante as consultas e coletas de exames. Apesar disso, a descoberta (diagnóstico) e a possibilidade de efetuar medidas preventivas e de tratamento, nesse caso, embora possa se associar ao trauma emocional próprio da descoberta de uma doença, pode ser encarada como um benefício do estudo. Além disso, às pacientes que eventualmente tenham diagnosticadas doenças, será oferecida consulta com Psicóloga, algo que já faz parte da rotina do Serviço de Mastologia.

Caso concorde em participar, sua participação será **totalmente voluntária, sem nenhum tipo de remuneração ou pagamento**. Todos os dados da sua participação, bem como resultados de exames ou testes, serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para os profissionais envolvidos nesse estudo, que terão acesso apenas quando necessário. Além disso, a aceitação ou não de participar da Pesquisa em nada afetará seu atendimento de rotina (consulta com Mastologista), ofertada pelo SDM e que já aconteceria independentemente de sua participação ou não na Pesquisa. Lembramos também, que, mesmo concordando em participar da pesquisa inicialmente você também poderá abandonar esse estudo **a qualquer momento** ou **retirar o seu consentimento**, sem que isso resulte em **qualquer penalidade** ou **perda de seus direitos onde recebe atendimento médico**.

Endereço do responsável pela pesquisa:

Nome: LUIZ GONZAGA PORTO PINHEIRO

Instituição: GRUPO DE EDUCAÇÃO E ESTUDO ONCOLÓGICOS - GEEON

Endereço: RUA PAPI JÚNIOR, 1511 – BAIRRO RODOLFO TEÓFILO, 60441-700

Telefones para contato: (85) 3283-6700

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado _____, _____ anos, RG _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa.

Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, ___/___/___

_____	_____	_____
Participante da Pesquisa	___/___/___	Assinatura
 LUIZ GONZAGA PORTO PINHEIRO		_____
Pesquisador	___/___/___	Assinatura
_____		_____
Testemunha (se Participante não souber ler)	___/___/___	Assinatura
_____		_____
Profissional que aplicou o TCLE	___/___/___	Assinatura