



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

CLÉSSIA BEZERRA ALVES MORATO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
CÂNCER DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS TUMORAIS**

Recife
2019

CLÉSSIA BEZERRA ALVES MORATO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
CÂNCER DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Linha de Pesquisa: Modelos Morfofisiológicos e Imunológicos das Doenças

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto

Coorientador (a): Dra. Elyda Gonçalves de Lima

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

M831a Morato, Cléssia Bezerra Alves
Avaliação da prevalência do papilomavírus humano (HPV) em
câncer de mama e sua correlação com as características clínicas
tumoriais/ Cléssia Bezerra Alves Morato. – 2019.
57 f.; il.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto .
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em
Patologia. Recife, 2019.
Inclui referências e anexo.

1. Papillomaviridae. 2. Neoplasias da mama. 3. Papillomavirus
humano. 4. Imunohistoquímica. I. Silva Neto, Jacinto da Costa
(Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 296)

CLÉSSIA BEZERRA ALVES MORATO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
CÂNCER DE MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS
CLÍNICAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestra em Patologia.

Aprovada em: 11/09/2019

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Ivone Antônia de Souza (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Bárbara Simas Chagas (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho a Deus e a minha família que sempre me incentivou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me dar força para seguir em frente independente das dificuldades.

A minha família, meus pais Célio e Cleide, meus maiores incentivadores e pessoas que mais acreditam na minha capacidade de vencer os desafios, meu muito obrigada!! Aos meus irmãos, Diêgo e Larissa, que também me incentivam, sempre acreditando e me estimulando a buscar meus sonhos.

A meu esposo Marcus Vinícius que me apoiou e ouviu nos momentos difíceis, sempre me ajudando e não me deixando desistir.

Ao meu orientador, Professor Jacinto Costa, por todos os ensinamentos e paciência dedicada.

Aos meus amigos do mestrado, pela amizade construída, por todos os ensinamentos compartilhados, momentos de muito aprendizado e companheirismo que levarei comigo. Ao meu amigo Giwellington, pelas orientações e ajuda científica, agradeço de coração. Aos amigos da patologia do Hospital das Clínicas da UFPE em especial a Sandra e Romildo.

Ao meu amigo Arthur Hipólito pela amizade dedicada, pelo apoio pessoal, e todas as orientações acadêmicas, por ouvir todos os problemas e sempre me ajudar em todas as etapas.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Patologia, pelos ensinamentos e contribuição na minha formação acadêmica. A coordenação do curso, na figura da Professora Manuela figueiroa, da Secretária Margarete Valdevino, por acompanhar nossa trajetória ao longo do curso com muita paciência e dedicação.

Aos meus amigos do trabalho, Professor Emerson, Mayara e Rosilene, que também contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui, entendendo as minhas ausências, me dando suporte e me apoiando sempre que precisei.

RESUMO

A neoplasia mamária é considerada um importante problema de saúde pública no mundo, no Brasil é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres. Os tumores mamários são classificados histologicamente de acordo com a localização e o tecido afetado. Evidências apontam que infecções persistentes com variantes de Papilomavirus humano (HPV) promovem a inibição de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular e supressão de moléculas antitumorais do sistema imunológico atuando de forma importante no processo de progressão tumoral e metástase. O presente estudo teve como objetivo realizar análise sobre a prevalência do HPV, sua influência no desenvolvimento do câncer de mama e sua correlação com as características clínicas tumorais. Foram selecionadas pacientes do sexo feminino diagnosticadas com câncer de mama no ano de 2017, no setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), foram selecionados 50 casos positivos para o câncer de mama. Avaliamos os laudos histopatológicos e de imunohistoquímica do banco de dados e após foram realizados cortes histológicos nos blocos de biópsia e a extração de DNA do material parafinado e em seguida foi realizada a PCR. Quanto a presença do vírus HPV, verificou-se a prevalência do HPV em 90% (45/50) do material analisado. O câncer de mama foi mais frequente em mulheres na faixa etária de 60 anos ou mais (19/50), o HPV também foi mais prevalente nessa faixa etária. As amostras foram analisadas quanto a presença ou ausência de metástase e sua correlação com o vírus HPV. O *Papillomavírus humano* foi encontrado em todos os tecidos tumorais primários que apresentaram metástase. O carcinoma ductal apresentou a maior prevalência com 41 mulheres diagnosticada com esse subtipo histológico e o HPV foi mais prevalente nesse grupo. O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente na população analisada foi o luminal, sendo também o subtipo molecular que apresentou maior prevalência do DNA viral. A verificação da prevalência do HPV de acordo com os marcadores moleculares foi mais encontrado no KI67 $\geq 14\%$ (94%), ER 93%, PR 91% e HER2 91%, por último o KI67 $< 14\%$ apresentou 83%, apesar da alta prevalência do HPV verificada nesta população a avaliação estatística não foi significativa. Conclui-se que a prevalência do HPV nos carcinomas invasivos analisados nesse estudo foi significativa e apresentou alta correlação com os subtipos ductal e luminal e esteve presente em todos os tumores primários que apresentaram

metástase. O HPV está presente em grande parte das amostras de tumores de mama avaliadas neste estudo e em outras pesquisas. Apesar da variação entre a prevalência do HPV nos estudos analisados é possível observar que quando avaliado a prevalência do HPV de alto risco (16 e 18) e comparado com genes e moléculas de regulação do ciclo celular é possível verificar que as células apresentaram maior percentual de alterações neoplásicas e imortalização celular.

Palavras-chave: Papillomaviridae. Neoplasias da mama. Papillomavirus humano. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Breast cancer is considered a major public health problem in the world, in Brazil it is the most common type of cancer among women. Breast tumors are histologically classified according to location and affected tissue, the most prevalent being ductal and lobular carcinoma. Evidence indicates that persistent infections with human papillomavirus (HPV) variants promote the inhibition of genes responsible for cell cycle control and suppression of antitumor molecules of the immune system, acting importantly in the process of tumor progression and metastasis. The present study aimed to analyze the prevalence of HPV, its influence on the development of breast cancer and its correlation with clinical tumor characteristics. Female patients diagnosed with breast cancer were selected in 2017, in the Pathological Anatomy sector of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco (HC / UFPE), 50 positive cases for breast cancer were selected. We evaluated the histopathological and immunohistochemical reports of the database and histological sections were performed on the biopsy blocks and DNA extraction from the paraffin material and then PCR. As for the presence of HPV virus, HPV prevalence was verified in 90% (45/50) of the analyzed material. Breast cancer was more frequent in women aged 60 years or older (19/50), HPV was also more prevalent in this age group. Samples were analyzed for the presence or absence of metastasis and its correlation with HPV virus. Human papillomavirus has been found in all primary tumor tissues that have metastasized. Ductal carcinoma had the highest prevalence with 41 women diagnosed with this histological subtype, and HPV was more prevalent in this group. The most prevalent molecular subtype of breast cancer in the analyzed population was the luminal, being also the molecular subtype that presented the highest prevalence of viral DNA. Prevalence of HPV according to molecular markers was more frequently found in KI67 $\geq 14\%$ (94%), ER 93%, PR 91% and HER2 91%, lastly KI67 $< 14\%$ showed 83%, despite the high prevalence of HPV verified in this population the statistical evaluation was not significant. It was concluded that the prevalence of HPV in the invasive carcinomas analyzed in this study was significant and showed a high correlation with the ductal and luminal subtypes and was present in all primary tumors that metastasized. HPV is present in most of the breast tumor samples evaluated in this study and other research. Despite the variation in the prevalence of HPV in the

studies analyzed, it is possible to observe that when the prevalence of high-risk HPV (16 and 18) is evaluated and compared with cell cycle regulation genes and molecules, it is possible to verify that the cells present a higher percentage of neoplastic changes and cell immortalization.

Key-words: Papillomaviridae. Breast neoplasms. Human papillomavirus. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Mama com tumor.....	18
Figura 2-	Genes do HPV 16 envolvidos no ciclo viral.....	26
Figura 3-	Coilócito no tecido mamário.....	28
Quadro 1-	Características atribuídas a classificação dos tumores malignos TNM.....	21
Quadro 2-	Classificação molecular do Câncer de mama.....	23
Gráfico 1-	Frequência de idade das participantes da pesquisa.....	35
Gráfico 2-	Classificação histológica dos tipos de câncer de mama.....	36
Gráfico 3-	Classificação molecular do câncer de mama.....	37
Gráfico 4-	Frequência do HPV no Câncer de mama invasivo.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Frequência do Papillomavírus humano relacionado as fatores clínico-patológicos em carcinomas de mama.....	40
Tabela 2-	Frequência do Papillomavírus humano relacionado aos marcadores moleculares em carcinomas mamários.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

BCL2	Proteína relacionada a apoptose
CK	Citoqueratinas
E2F	Fator de Transcrição E2F
ER	Receptor de Estrógeno
E1, E2, E4, E5, E6 e E7	Proteína Viral Precoce do HPV 1, 2, 4, 5, 6 e 7
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidermal 2 (Epidermal growth factor receptor 2)
HPV	<i>Papilomavirus humano</i>
LCR	Região de Controle Longo
L1 e L2	Proteína tardias do HPV codificante do capsídeo viral 1 e 2
nm	Nanômetros
PR	Receptor de Progesterona
p53	Proteína de massa de 53 kda, supressora de tumor
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pRB	Proteína do Retinoblastoma
TRH	Terapia de reposição hormonal
TNM	Sistema de estadiamento tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	17
2.2	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA.....	20
2.3	CLASSIFICAÇÃO TNM.....	21
2.4	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR.....	22
2.5	TRATAMENTO.....	23
2.6	<i>PAPILOMAVIRUS HUMANO</i>	24
2.6.1	Mecanismos de infecção celular pelo HPV	26
2.6.2	HPV no desenvolvimento do câncer de mama	29
2.7	DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA E DO HPV.....	31
2.8	PREVENÇÃO DO HPV.....	31
3	MÉTODOS	32
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	32
3.2	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	32
3.3	LOCAL DO ESTUDO.....	32
3.4	POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO.....	32
3.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	33
3.6	OBTENÇÃO DO MATERIAL ANALISADO.....	33
3.7	DETECÇÃO DO DNA DO HPV.....	33
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4	RESULTADOS	35
5	DISCUSSÃO	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
6.1	PERSPECTIVAS.....	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	56

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia mamária é considerada um importante problema de saúde pública no mundo, no Brasil é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, excluindo o câncer de pele não melanoma, a sua estimativa para o biênio 2018-2019 é de 59.700 novos casos, com taxa de mortalidade ainda elevada apresentando 12,9 mortes por 100.000 mulheres, as regiões com maior frequência no Brasil são as regiões Sul e Sudeste. O câncer de mama corresponde a 25,2% de todos os tumores malignos femininos e a uma taxa de incidência de 43,3/100 mil no Brasil. No Nordeste estima-se aproximadamente 40,36/100.000 mulheres com câncer de mama, em Pernambuco a estimativa é de 54,37/100 mil e na capital a incidência de 85,34/100 mil mulheres. A taxa de sobrevida nos últimos cinco anos aumentou na maioria dos países desenvolvidos, no Brasil a taxa de sobrevida também aumentou, embora seja considerado país em desenvolvimento (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2019).

O câncer de mama é a neoplasia de maior incidência entre as mulheres em todo o mundo, sendo considerada uma doença complexa que apresenta diferentes características celulares, moleculares, comportamento clínico e tratamento bastante variado, a neoplasia mamária se origina a partir do crescimento desordenado de células geneticamente modificadas que possuem alta capacidade de invasão tecidual. Alguns tipos evoluem de forma rápida e outros mais lentamente, geralmente apresenta bom prognóstico, principalmente quando diagnosticado precocemente. É a principal causa de morte de mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BRASIL, 2019; KHODABANDEHLOU et al, 2019).

O câncer de mama é uma doença e possui como principais fatores desencadeantes a idade acima de 55 anos, menarca antes dos 12 anos, nuliparidade, estilo de vida (consumo de álcool, excesso de peso, sedentarismo, exposição à radiação ionizante), história reprodutiva, terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, histórico familiar e mutações genéticas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017, BRASIL, 2018a, LAWSON et al, 2018, BRASIL, 2019)

Os tumores mamários são classificados histologicamente de acordo com a localização e o tecido afetado, sendo os mais prevalentes o carcinoma ductal e lobular que juntos representam 90% dos tumores mamários. Devido à complexidade e variação genética apresentadas pelas células que compõem o tecido mamário, foram

identificados marcadores hormonais e teciduais que classificam os tipos tumorais a partir da sua presença na linhagem de células tumorais. Os marcadores moleculares foram inicialmente identificados e associados à resposta preditiva, à terapia sistêmica e são reconhecidos como sendo os principais determinantes no diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer de mama (MEATTINI *et al*, 2016; BIANCHINI *et al*, 2016; RAKHA, GREEN, 2017)

De acordo com essa classificação molecular foram identificados cinco subtipos de tumores de mama o Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER2, basal-like e normal-like. As sociedades de oncologia recomendam considerar estes subtipos moleculares para classificar e orientar o tratamento do câncer de mama. A classificação molecular das neoplasias mamárias representa uma tentativa de agrupar os tumores por fenótipos e classificar os pacientes de acordo com o prognóstico, já que esses fenótipos determinados pela expressão destes marcadores podem revelar as características biológicas e evolutivas de cada grupo tumoral (WEIGELT, REIS-FILHO, 2009; MEATTINI *et al*, 2016; BIANCHINI *et al*, 2016).

Nos últimos anos alguns vírus potencialmente carcinogênicos tem sido associado ao desenvolvimento de neoplasias, entre eles o *Papillomavirus humano* (HPV). Evidências apontam que infecções persistentes com variantes deste tipo viral promovem a inibição de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular e supressão de moléculas antitumorais do sistema imunológico atuando de forma importante no processo de progressão tumoral e metástase (TERMINI, VILLA, 2008; MOODY, LAIMINS, 2010; KHODABANDEHLOU *et al*, 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar análise sobre a prevalência do HPV e sua correlação com as características clínicas e tumorais das população analisada.

1.1.2 Objetivos específicos

- Classificar os tumores mamários de acordo com os tipos histológico, moleculares e perfil de receptores hormonais;
- Avaliar a prevalência do HPV no material analisado;
- Associar a presença do HPV com as características clínicas das pacientes;
- Associar a presença do HPV com a classificação histológica e perfil molecular do material analisado.

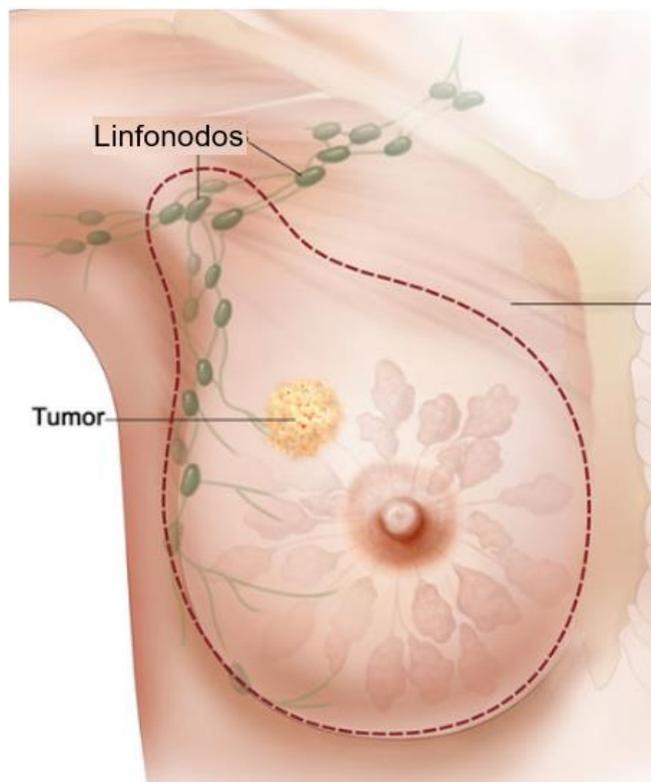
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

É a neoplasia mais incidente na população feminina sendo considerado um importante problema de saúde pública no mundo, de acordo com a publicação da GLOBOCAN em 2012, estima-se 2,1 milhões de novos casos de câncer e 2 mil novos óbitos causados pela doença. O câncer de mama corresponde a 25,2% de todos os tumores malignos femininos. No Brasil a sua estimativa para os anos 2018-2019 é de 59.700 novos casos, com taxa de mortalidade ainda elevada apresentando 12,9 mortes por 100.000 mulheres (BRAY, 2018; BRASIL, 2018a; BRASIL, 2019). No estado de Pernambuco a estimativa é de 53,12/100 mil e em Recife a incidência é de 63,22/100 mil mulheres. A mortalidade por câncer vem aumentando ao longo dos anos em todo o mundo, no município de Recife-PE, no período entre os anos de 2007 a 2016, também se verificou aumento na mortalidade por câncer, em especial nos óbitos por câncer na mama que apresentou um aumento de 21,7% (PERNAMBUCO, 2018).

A mama é uma glândula que apresenta estrutura celular complexa, é constituída por um epitélio secretor (parênquima) coberto por um tecido estromal composto de tecido conectivo, adiposo e capilares. A porção parenquimal é composta por dois tipos de células epiteliais: as luminiais glandulares e as mioepiteliais basais. Essas células associadas ao estroma, produzem os componentes da matriz extracelular, que assim como hormônios e fatores de crescimento são essenciais para o crescimento e fisiologia da glândula mamária (Figura 1) (GUIMARÃES, 2008).

Figura 1- Mama com tumor



Fonte: WINSLOW, 2013. Disponível em:
<https://www.teresewinslow.com/breast/5cfyggq3a1tvi8s0ps7uo25fn9guuq5> Acesso em: 08-08-2019

A neoplasia mamária é uma patologia e possui fatores de risco que aumentam as chances do seu desenvolvimento, tais como, a idade acima de 55 anos, menarca precoce (antes dos 12 anos), não ter filhos (nuliparidade), consumo de bebida alcoólica, obesidade, sedentarismo, exposição à radiação ionizante, história reprodutiva, terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, histórico familiar e mutações genéticas (BRCA1 e BRCA2). Estudos publicados nos últimos anos têm associado a presença de vírus potencialmente carcinogênicos ao desenvolvimento de neoplasias, entre eles o *Papilomavirus humano* (HPV), e o vírus Epstein Barr, embora sejam necessário a realização de mais pesquisas visando compreender a atuação desses microrganismos oncogênicos no desenvolvimento do câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017, BRASIL, 2018a, LAWSON et al, 2018, BRASIL, 2019).

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública no mundo, justificada pela alta incidência, morbidade, mortalidade e o alto custo do tratamento, a

incidência é maior em países desenvolvidos, porém alguns países em desenvolvimento apresentam também altas taxas de incidência da doença e as taxas de mortalidade variam entre diferentes regiões do mundo. Nos países subdesenvolvidos o diagnóstico do câncer de mama é tardio e quando diagnosticado já se apresenta em estágios mais avançados, nesses casos o índice de remissão da doença é menor, o que aumenta a morbidade relacionada ao tratamento comprometendo a qualidade de vida e diminuindo a sobrevida dos pacientes (GURGEL, 2011, BRASIL, 2015). No Brasil o Ministério da Saúde tem como uma das prioridades da agenda da Política Nacional de Saúde o controle do câncer de mama visando trazer melhorias no diagnóstico e acompanhamento da população acometida. O Ministério da Saúde através da publicação “Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil”, recomenda o diagnóstico da doença em estágios iniciais através das ações de rastreamento e diagnóstico precoce, indicando a mamografia bienal para mulheres na faixa etária de 50 a 69 anos e o acompanhamento das pacientes por profissionais de saúde capacitados para avaliar e orientar os casos suspeitos e serviços de saúde preparados para garantir a confirmação diagnóstica oportuna e com qualidade (BRASIL, 2015; MIGOWSKI et al, 2018). As ações de rastreamento e diagnóstico precoce atualmente indicadas são a mamografia, ultrassom, ressonância nuclear magnética, estratégias de conscientização da população, orientações sobre os sinais e sintomas. O ministério da saúde não indica mais o auto exame da mama e o exame clínico da mama como uma avaliação de rastreamento pois de acordo com estudo publicados este exame não apresenta uma boa sensibilidade quando a patologia está no início e os nódulos se apresentam muito pequeno podendo não ser detectados, ainda orienta que os exames de imagem devem ser indicados a pacientes com alta suspeita para o diagnóstico do câncer de mama, onde o benefício do diagnóstico supera o risco de exposição às radiações (BRASIL, 2015; MIGOWSKI, 2018).

Os sinais e sintomas que justificam o encaminhamento da paciente para atendimento especializado em caráter urgente são qualquer nódulo mamário em mulheres com mais de 50 anos, nódulo mamário em mulheres com mais de 30 anos, que persistem por mais de um ciclo menstrual, nódulo mamário de consistência endurecida e fixo ou que vem aumentando de tamanho, em mulheres adultas de qualquer idade, descarga papilar sanguinolenta unilateral, lesão eczematosa da pele

que não responde a tratamentos tópicos, homens com mais de 50 anos com tumoração palpável unilateral, presença de linfadenopatia axilar, aumento progressivo do tamanho da mama com a presença de sinais de edema, como pele com aspecto de casca de laranja, retração na pele da mama, mudança no formato do mamilo (BRASIL, 2015).

2.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

O carcinoma mamário é uma doença heterogênea que consiste de um número crescente de subtipos biológicos tumorais e representam a maioria das neoplasias malignas mamárias. Os tipos histológicos dessa neoplasia podem ser divididos em carcinomas *in situ* e invasivo, os carcinomas *in situ* são identificados quando células tumorais estão presentes nos ductos ou lóbulos sem degradação da membrana basal ou invasão estromal, os carcinomas são classificados como invasivos quando as células tumorais atravessam o estroma, estrutura presente nos limites dos ductos e lóbulos mamários (HENG et al, 2009).

Os carcinomas podem ainda ser divididos genericamente em carcinoma lobular e carcinoma ductal, pacientes que apresentam alterações na região lobular têm um risco aumentado em 8 a 10 vezes de desenvolver câncer de mama, quando comparados com as mulheres sem esse diagnóstico. O restante são classificados como neuroendócrino, tubular, medular, cribiforme, apócrino, metaplásico, mucinoso, inflamatório, micropapilar, cístico, mucinóide e papilar (HENG et al, 2009; LIANG et al, 2013; BRASIL, 2019)

O tumor de mama apresenta alterações heterogêneas e complexas que apresentam diferentes características clínicas, diferentes formas de evolução da doença, resposta a tratamentos, graus de agressividade e prognóstico variado. Histologicamente, as neoplasias de mama se diferenciam com base na sua morfologia geral, principalmente, estágio tumoral e grau, tipo histológico de proliferação, status e metástases através da invasão de linfonodos e vascular essas variáveis são importantes fatores prognósticos (RINTALA et al, 2005; RAKHA, GREEN, 2017).

2.3 CLASSIFICAÇÃO TNM

A classificação dos tumores mamários segue o sistema TNM que foi criado na década de 1940 baseado no trabalho de Pierre Denoix com o intuito de unificar a classificação anatômica e estadiamento dos tumores, é baseada na avaliação de três componentes principais: T- tamanho ou extensão, N - acometimento de linfonodos e M – metástase. A adição de números indica a extensão da malignidade (T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, N3, M0, M1) (WEIGELT, REIS-FILHO, 2009).

O estadiamento do câncer no momento do diagnóstico é um dos fatores que mais influenciam na sobrevida dos pacientes, a classificação dos tumores malignos foi proposta pela proposta pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). As características atribuídas a classificação dos tumores malignos encontram-se descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Características atribuídas a classificação dos tumores malignos TNM

ESTÁGIO	TNM	T- tamanho ou volume do tumor primário Tis- carcinoma in situ
0	Tis N0 M0	T1- tumor ≤2cm em sua maior dimensão T2- tumor com 2,1cm ≤ 5cm em sua maior dimensão
IA	T1 N0 M0	T3- tumor maior que 5 cm em sua maior dimensão T4 - qualquer T com extensão para pele ou parede torácica
IB	T0 N1mi M0 T1 Nimi M0	N-condição dos linfonodos regionais N0-ausência de metástases N1-metástases em linfonodos axilares móveis N2-metástases em linfonodos fixos N3- metástases em linfonodos infraclaviculares
IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0	M- presença ou ausência de metástase M0- ausência de metástase à distância M1- presença de metástase à distância
IIIA	T0 N2 M0 T1 N2 M0	
	T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0	
IIIB	T4 N0 T4 N1 T4 N2	
IIIC	TX N3 M0	
IV	TX NX M1	

Fonte: UICC, 2018

2.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

Devido à complexidade desta patologia e variação genética apresentadas pelas células que compõem o tecido mamário, através da expressão de genes, proteínas e a presença de receptores hormonais que os classificam de forma molecular, através da expressão desses receptores pela linhagem de células tumorais presente no microambiente, os marcadores hormonais mais utilizados são receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), e marcadores teciduais como o receptor do fator de crescimento epidérmico humano - EGFR (HER-2), Ki-67 que é um marcador de proliferação celular e citoqueratinas de alto peso molecular/basais CK 5, 6, 14, 17 foram inicialmente identificados e associados à resposta preditiva, à terapia sistêmica e agora são reconhecidos como sendo os principais determinantes no diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer de mama (MOODY, LAIMINS, 2010; GOBBI, 2012; RAKHA, GREEN, 2017).

De acordo com a classificação molecular foram identificados cinco subtipos de tumores de mama o Luminal A, apresenta células diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares e expressão de receptores de estrógeno e progesterona (RE+, RP+), ausência de HER2 e Ki-67 < 14%, o subtipo Luminal B que se origina em células luminais com expressão de RE+ e/ou RP+, ausência de HER-2 e Ki-67 elevado ($\geq 14\%$) e ainda o luminal HER-2 com RE+ e/ou RP+ e HER-2+, superexpressor de HER-2 (não luminal) que possui o gene HER-2+ e RE- RP-, e os subtipos triplo negativos, o basal-like ou basalóide são fenótipos com características histológicas de células pouco diferenciadas e com alta taxa de proliferação, em sua maioria são triplo-negativos com os marcadores RE-, RP- e HER-2- (negativos) e expressão de citoqueratinas, e o subtipo normal-símile que apresenta negatividade para os marcadores comuns de mama e o tipo claudin-low que apresenta RE- e ou RP- e HER-2- e baixa expressão de genes das claudinas e perda de moléculas de adesão (e-caderina); As claudinas são proteínas transmembranas envolvidas na adesão celular, portanto no câncer de mama onde há uma baixa expressão de algumas moléculas desse tipo há maior possibilidade migração celular e invasão tecidual (SERRA et al, 2014; BARROS,LEITE, 2015; BIANCHINI et al, 2016; MEATTINI et al, 2016).

Quadro 2. Classificação molecular do Câncer de mama

LUMINAL A	RE+, RP+, ausência de HER2 e Ki-67 < 14%
LUMINAL B	RE+ e/ou RP+, ausência de HER-2 e Ki-67 elevado ($\geq 14\%$)
LUMINAL HER-2	RE+ e/ou RP+ e HER-2+
SUPEREXPRESSOR DE HER-2 (não luminal)	HER-2+ e RE- RP-
TRIPLO NEGATIVO	RE-, RP- e HER-2- (negativos)

Fonte: Autor

2.5 TRATAMENTO

O tratamento e prognóstico da neoplasia mamária é orientado de acordo com as classificações histológicas, moleculares e TNM (RINTALA *et al*, 2005; BIANCHINI *et al*, 2016). O diagnóstico através de técnicas histomorfológicas no processo de caracterização das neoplasias é limitado atualmente, visto que, a expressão de marcadores moleculares é que vão determinar o tratamento específico e direcionar a melhor terapia a ser usada. Esses marcadores são identificados primariamente nas amostras de tecido tumoral, porém o crescimento intrínseco e a heterogeneidade desenvolvida no microambiente tumoral têm importância no diagnóstico e escolha da terapia individual. As variações entre as características moleculares das células do tumor primário e de suas metástases podem ser responsáveis pela baixa resposta terapêutica em diversos casos, como por exemplo, em pacientes com fenótipo variante entre doença primária e metastática. A heterogeneidade tumoral deve ser analisada desde a determinação do diagnóstico patológico (MEATTINI *et al*, 2016; RYSKA, 2016).

Apesar desta complexidade, atualmente as decisões clínicas são baseadas na expressão dos biomarcadores endócrino como o receptor de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e receptores epiteliais como o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), e Ki-67. A expressão desses marcadores moleculares é considerado fator preditivo para a resposta a tratamentos e prognóstico a longo prazo em relação ao desenvolvimento da patologia. A superexpressão de HER2 geralmente

é um marcador de resistência a certos tratamentos endócrinos e quimioterápicos. A caracterização do status dos biomarcadores antes do tratamento cirúrgico é crucial quando a terapia sistêmica primária é uma opção terapêutica. A classificação molecular das neoplasias mamárias representa uma tentativa de agrupar os fenótipos tumorais, categorizando os pacientes em distintos grupos prognósticos. Estes fenótipos determinados pela expressão destes marcadores imunohistoquímicos podem revelar as características biológicas e evolutivas de cada grupo (MEATTINI *et al*, 2016; BIANCHINI *et al*, 2016; RAKHA, GREEN, 2017). Os tratamentos indicados e acordo com a classificação molecular são hormonioterapia, trastuzumabe quimioterapia, drogas citotóxicas como a carboplatina, agentes inibidores da PARP (BARROS, LEITE, 2015).

2.6 PAPILOMAVIRUS HUMANO

Atualmente foram sequenciados mais de 200 tipos de *Papilomavirus* (PV), destes, aproximadamente 120 são classificados como *Papilomavirus humano* (HPV) e cerca de 40 são responsáveis por infectar o trato genital humano podendo causar manifestações clínicas, pertencem à família *Papilomaviridae*, é um vírus com diâmetro de 55nm, estrutura icosaédrica não envelopada composta por um capsídeo consistindo de 72 capsômeros, possuem o material genético covalentemente fechado formado por uma dupla fita de DNA com aproximadamente 8000 pares de bases (BERNARD *et al.*, 2010; GURGEL, 2013; VAN DOORSLAER, 2013, DAUDT *et al*, 2016). Seu DNA está dividido em uma região codificante, com oito fases de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*) que codificam as proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6, E7 do inglês, *Early*) e as proteínas envolvidas na formação do capsídeo (L1 e L2, do inglês, *Late*), e região não codificante chamada LCR (do inglês, *Long Control Region*), implicada no controle da replicação do DNA viral e da transcrição dos genes virais (ZUR HAUSEN, 2002; DOORBAR *et al*, 2012).

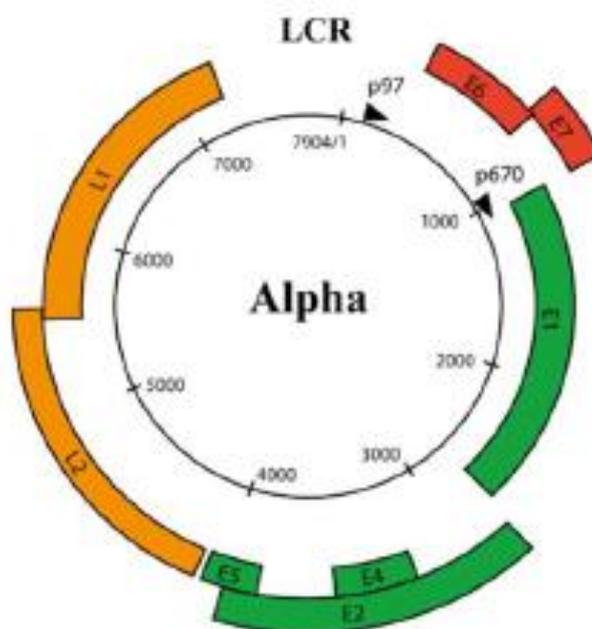
Os *Papilomavírus humanos* são divididos em cinco gêneros, classificados a partir do sequenciamento genético do DNA, ciclo de vida e sua capacidade de causar doenças, sendo eles Alpha-PVs, Beta-PVs, Gamma-PVs, Mu-PVs e Nu-PVs. Os HPVs dos gêneros beta e gama, geralmente, são responsáveis por causarem infecções assintomáticas em pessoas imunologicamente competentes, esses vírus

são bem adaptados ao seu hospedeiro e geralmente, completam seu ciclo de vida sem originar patologias (DOORBAR *et al*, 2012).

Os HPVs são classificados em alto ou baixo risco oncogênico de acordo com a sua associação ao desenvolvimento de lesões epiteliais malignas, os HPVs de baixo risco causam geralmente infecções assintomáticas ou papilomas benignos cervicais, que podem persistir por anos, mas que são, em sua maioria, deletados pelo sistema imunológico do hospedeiro. Contrariamente, os tipos de HPV de alto risco estão associados com o desenvolvimento de cânceres humano, incluindo quase todos os casos de câncer cervical, anogenitais, tumores de cabeça e pescoço, mama e pulmão (ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 2002; DE VILLIERS *et al.*, 2005; DOORBAR *et al.*, 2012).

O gênero *Alphapapilomavírus* (Alpha-PVs) infecta os seres humanos e são divididos em dois grupos, vírus mucosotrópicos (que infectam células da camada basal da mucosa) e os vírus cutaneotrópicos (que infectam células da camada basal da pele). Os Alpha-PVs de baixo risco (6 e 11) considerados cutâneotrópicos são responsáveis pelo aparecimento de verrugas comuns e planas (papiloma) e de lesões genitais cutâneas (condiloma), podendo causar lesões mais agressivas em indivíduos com deficiência imunológica. Alguns membros deste gênero Alpha são classificados como de alto risco pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sendo eles os HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (DOORBAR *et al*, 2012; HENG,2009).

Figura 2. Genes do HPV 16 envolvidos no ciclo viral



Fonte: DOORBAR, 2012

2.6.1 Mecanismos de infecção celular pelo HPV

O ciclo biológico do HPV está ligado ao ciclo celular das células epiteliais hospedeiras onde a replicação viral acompanha a diferenciação e a maturação, sendo nas camadas superiores do epitélio onde se encontra maior atividade de replicação viral e maior quantidade de partículas virais (PORNTHANAKASEM et al, 2001; DOORBAR, 2012; ZUR HAUSEN, 2002; LAWSON, 2009).

O detalhamento do ciclo de replicação viral do HPV foi obtido a partir de estudos de células epiteliais do colo do útero, podendo apresentar comportamento diferenciado no câncer de mama. A expressão dos oncogenes virais está estreitamente relacionada com a diferenciação das células infectadas que migram em direção à superfície epitelial (DOORBAR, 2012; ZUR HAUSEN, 2000; ZUR HAUSEN, 2002).

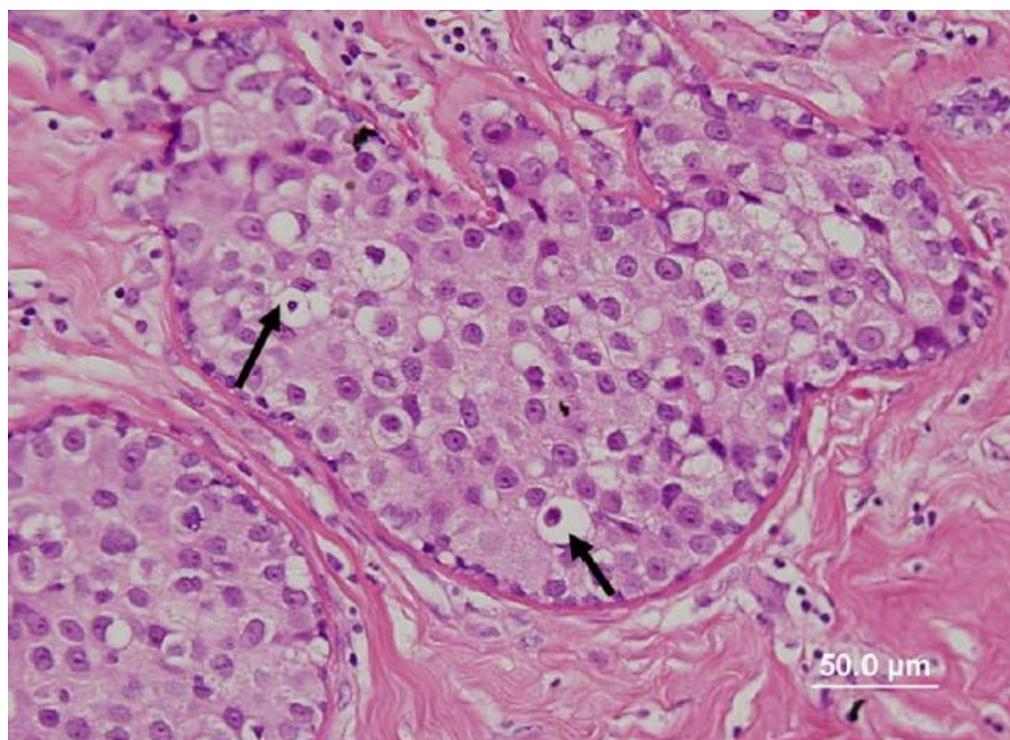
Após a entrada do HPV nas células, os genomas virais estão caracterizados como plasmídeos nucleares, ao chegar ao núcleo celular inicia a replicação viral. A proteína E1 forma heterodímeros com E2, conseqüentemente, esse complexo E1-E2 reconhece a célula hospedeira (DOORBAR, 2012). A formação desse complexo, E1-E2, na origem de replicação causa distorção no DNA viral, facilitando o recrutamento de mais moléculas E1 e a eventual perda de E2, que provoca o aumento da expressão dos genes E6 e E7. Os tipos de HPV de alto risco apresentam uma série de proteínas, identificadas como precoce (E1-E7) e tardia (L1 e L2). Embora cada proteína viral exerça uma função na replicação viral, apenas uma pequena parte dessas proteínas precoces participam da transformação celular. A transformação ocorre através da ação das oncoproteínas HPV E6 e E7, que funcionam em conjunto para desregular o ciclo celular, inibir a apoptose e estimular a progressão do ciclo celular inibindo os genes de supressão tumoral, a oncoproteína E6 inibe a p53 e a BCL2 aumentando a instabilidade cromossômica e a resistência a apoptose, a oncoproteína E7 inibe a pRB, resultando na liberação de um fator de transcrição que promove a proliferação celular (E2F), essa oncoproteína viral também regula positivamente o gene da fase S do ciclo celular (ciclina A e E), porém inibe os inibidores de quinase dependentes de ciclina P21 e P27 que levam a proliferação descontrolada das células. As oncoproteínas do HPV também interagem com os genes BRCA1 e BRCA2, principalmente com o BRCA1, esses genes são classificados como supressores tumorais, pois estão relacionados a regulação do metabolismo celular, tais como reparo de danos ao DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular. Alterações nesses genes estão associadas ao desenvolvimento de câncer de mama e ovário (COELHO et al, 2018; KHODABANDEHLOU et al, 2019).

A expressão da proteína p53 apresentou-se significativamente inibida no câncer de mama HPV positivo quando comparado ao tumor mamário HPV negativo, indicando que os HPVs podem ser biologicamente ativos no câncer de mama (LAWSON, 2016; LAWSON et al, 2018).

As oncoproteínas E5 e E6 do HPV atuam inicialmente na transformação epitelial, podendo degradar a citoqueratina celular e causar a formação do halo citoplasmático perinuclear e aumento do volume do núcleo, causando o aparecimento do coilócito (figura 3). Os coilócitos podem ser identificados em análise histológica de

tecidos benignos demonstrando a presença precoce e transformação epitelial causada pela infecção pelo HPV (HENG et al, 2009; LAWSON et al, 2009).

Figura 3. Coilocito no tecido mamário



Fonte: LAWSON e HENG, 2010

A superexpressão de E6 e E7 inativa as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb, respectivamente, que são responsáveis pelo controle de replicação celular. A expressão de E6 e E7 nas camadas inferiores do epitélio dirige a célula para a fase S, no entanto, durante a divisão celular, uma das células filhas continua na camada basal, enquanto a outra célula migra para a camada supra basal, onde há expressão de elevados níveis de proteínas tardias, responsáveis pela montagem viral. Dessa forma, ocorre a diferenciação celular, levando à amplificação do DNA viral (PORNTANAKASEM et al, 2001; ZUR HAUSEN, 2002; TERMINI,VILLA, 2008; DOORBAR, 2012; MEATTINI *et al*, 2016). Publicações atuais demonstram que os HPVs de alto risco também podem ter uma influência oncogênica indireta no desenvolvimento do câncer de mama através da enzima APOBEC3B, que é uma proteína codificada pelo Gene APOBEC3B. A proteína APOBEC3B foi identificada

como uma enzima capaz de gerar mutações no câncer de mama e pode estar associada a tipos agressivos de tumor de mama (OHBA et al, 2014).

2.6.2 HPV no desenvolvimento do câncer de mama

O HPV é considerado um agente carcinogênico e apresenta mecanismos de infecção celular bem estabelecidos em alguns tipos de tecidos. Características citológicas compatíveis com a presença do HPV (presença de coilócitos) foram identificadas em análises histológicas de tumores em outros sítios anatômicos, tais como na mama, indicando a possível influência desse microrganismo no desenvolvimento de neoplasias mamárias (ZUR HAUSEN, 2002; LI et al, 2015).

Estudos como o de Lawson e Heng (2010) têm levantado a hipótese de que a infecção pelo HPV pode estar envolvida na carcinogênese mamária, sendo considerada uma relação provável, porém não conclusiva. A identificação do HPV na mama é difícil pois a carga viral é extremamente baixa quando comparada a carga viral em outros tecidos, como no cólo do útero. Entretanto HPVs de alto risco tem sido detectados com frequência em estudos que pesquisam o HPV nos tumores mamários, sua prevalência e os tipos virais mudam de acordo com a região geográfica analisada (BAE, KIM, 2016, LAWSON, 2016). A prevalência de câncer de mama HPV positivo variam de 0 a 2% em algumas províncias da China para 86% na América do Norte, é possível que essas variações nos resultados dos estudos citados sejam provenientes da metodologia utilizada na análise das amostras, a baixa carga viral e a baixa frequência de HPV no câncer de mama em algumas pessoas, podendo interferir significativamente nos resultados obtidos (LI et al, 2015; HENG *et al.*, 2009; LAWSON, HENG, 2010; QUREISHI et al, 2017).

Contudo, estudos analisados demonstram haver associação entre o HPV e o desenvolvimento do câncer de mama, identificando HPVs de alto risco, através de diferentes metodologias. Os tipos virais mais prevalentes na maioria dos países são os tipos 16 e 18, porém os tipos 33 e 58 são mais prevalentes na China e no Japão (DE VILLIERS, 2005; SIMÕES *et al.*, 2012; LI et al, 2015; BAE E KIM, 2016; LAWSON, 2016; ISLAM *et al*, 2017). De acordo com estudos publicados recentemente pode-se observar que a prevalência dos HPVs de alto risco é cerca de quatro vezes maior em pacientes com câncer de mama quando comparados com amostras benignas de

tecido mamário, é estabelecido também o potencial oncogênico dos HPV de alto risco, portanto é possível que esse tipos virais podem ter um papel importante no desenvolvimento câncer de mama (LAWSON 2015; BAE, KIM, 2016; LAWSON, 2016; GONÇALVES, 2016). Alguns questionamentos ainda não têm respostas sobre o possível papel do HPV no desenvolvimento do câncer de mama, a detecção do DNA do HPV em tecidos mamários normais e em biópsias de mulheres com câncer de mama, levanta dúvidas sobre a verdadeira influência do HPV no desenvolvimento tumoral. Porém quanto a avaliação da oncoproteína E7 é possível observar sua alta expressão nos tecidos mamários benignos positivos para o HPV quando comparados com a baixa expressão da oncoproteína E7 nesses mesmos pacientes quando desenvolvem câncer de mama, o que demonstra que o HPV é mais influente na fase inicial de oncogênese mamária onde as alterações ocorrem principalmente a nível molecular e ainda não são perceptíveis alterações celulares significativas (LIANG et al, 2013; LI et al, 2015; LAWSON, 2016; BAE, KIM 2016; LAWSON, 2018). A presença de coilócitos em análise histológica de tecidos mamários benignos demonstra as alterações precoces e transformação epitelial causada pela infecção pelo HPV, um grupo de mulheres que apresentaram coilócitos em análise histopatológica mamário foram acompanhadas e posteriormente foi verificado a expressão de oncoproteínas E6 e E7 nessas pacientes o que demonstra a atividade viral do HPV (LAWSON et al, 2009; LAWSON, 2018). Além disso, um estudo realizado por Yasmeeen e colaboradores (2007) demonstraram que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV foram capazes de transformar células tumorais não invasivas da mama numa forma invasiva.

O processo de transmissão do HPV para a mama ainda não está totalmente esclarecido, é conhecido que a transmissão sexual ocorre através do contato entre as superfícies de células epiteliais (LAWSON, 2016), outros estudos mais recentes apontam a disseminação do HPV através das células sanguíneas e demonstrando inclusive que as mulheres apresentavam o mesmo tipo viral em tumores de mama e infecções cervicais (PORNTHANAKASEM *et al.*, 2001; CHANG *et al*, 2013; VINODBHAI, 2013). Foi identificado também a presença do DNA do HPV no tecido areolar e no leite materno, sugerindo também transmissão materna fetal (ANTONSSON *et al.*, 2011; GLENN *et al*, 2012).

2.7 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA E DO HPV

São identificadas alterações citológicas compatíveis com a presença do vírus nas células analisadas, as principais estruturas indicadoras da presença do HPV na estrutura celular são os coilócitos, que apresentam como principais características halo perinuclear amplo, claro e irregular, núcleos aumentados de tamanho e com bordas irregulares e binucleações podem ser observadas (STANLEY et al, 2007). A confirmação das lesões é realizada pelo exame histopatológico através do qual é retirado um fragmento do tecido para análise. Diante da dificuldade em fechar o diagnóstico do câncer de mama causado pela grande variedade de alterações moleculares que podem originar a patologia, outra técnica mais específica é utilizada, a imunohistoquímica, é uma técnica que utiliza anticorpos específicos para receptores celulares ou hormonais, com o objetivo de caracterizar o tecido a partir de proteínas e receptores celulares presentes em sua superfície, também é usado para identificar o HPV através da detecção de oncoproteínas expressas pelo vírus (FERRO, 2010). Testes moleculares também são muito utilizados, atualmente, e apresentam maior sensibilidade e especificidade pois através desses testes o material genético do vírus é detectado antes mesmo de causar alterações celulares visíveis microscopicamente, para a detecção molecular do HPV o teste mais difundido atualmente é a Reação em cadeia de Polimerase (PCR) que consiste na amplificação da cadeia de DNA viral através da utilização de um primer específico que identifica uma região codificadora do vírus pesquisado e permite a amplificação de milhões de cópias, facilitando sua identificação (SIMÕES et al, 2012).

2.8 A PREVENÇÃO DO HPV

O desenvolvimento de vacinas foi de grande importância na prevenção do HPV, pois é um vírus, comprovadamente carcinogênico. As vacinas profiláticas contra o HPV apresentam-se de três formas, a bivalente que previne contra os tipos 16 e 18, a quadrivalente que combate aos tipos 16, 18, 6 e 11 e a nonavalente 16, 18, 6, 11, 31, 33, 45,52 e 58, que são os tipos mais prevalentes. A vacina quadrivalente foi licenciada pela primeira vez em 2006, sendo atualmente, amplamente usada em programas de imunização (GLENN et al, 2012).

3 METODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo retrospectivo, observacional e analítico.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº28508614.9.0000.5208 ao Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) obedecendo aos princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). As informações foram utilizadas exclusivamente para a execução do presente projeto e a identidade das participantes foi mantida em sigilo absoluto.

3.3 LOCAL DO ESTUDO

As amostras de mama parafinizadas bem como os laudos histopatológicos e de imunohistoquímica das pacientes selecionadas estavam arquivadas no setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE).

3.4 POPULAÇÃO ALVO E PERÍODO

Foram avaliados os laudos histopatológicos e de imunohistoquímica do banco de dados do setor de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), foram selecionadas as pacientes do sexo feminino diagnosticadas com câncer de mama no ano de 2017. Onde obteve-se 54 casos positivos para o câncer de mama, sendo excluídos os casos onde não foi possível resgatar os blocos de biópsias.

3.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Como critérios de inclusão tivemos material parafinado disponível no HC/UFPE de mulheres diagnosticadas com câncer de mama do ano de 2017, cujos blocos de biópsias foram localizados no serviço de Anatomia patológica do referido hospital. Como critérios de exclusão tivemos: amostras que não apresentaram boa conservação, blocos de biópsias mal emblocados e com material insuficiente para análise.

3.6 OBTENÇÃO DO MATERIAL ANALISADO

O estudo foi constituído por cinquenta amostras de tecido mamário parafinado que estavam arquivadas no setor de Anatomia Patológica do HC/UFPE e foram provenientes de pacientes do sexo feminino diagnosticadas com câncer de mama no ano de 2017. Todas as amostras parafinadas apresentavam laudo histológico e informações dos receptores de estrógeno, progesterona e HER-2, determinadas anteriormente por imunohistoquímica no próprio serviço.

3.7 DETECÇÃO DO DNA DO HPV

Foram obtidos cinquenta blocos de carcinomas embebidos em parafina de paciente com câncer de mama. Os fragmentos dos blocos foram analisados pelo patologista do serviço de saúde, em seguida cinco secções com espessura de 5µm foram cortadas no micrótomo e adicionadas em tubos de eppendorf estéreis. Após os cortes histológicos foi realizado a extração de DNA do material parafinado e em seguida foi realizada a PCR utilizando os oligonucleotídeos GP5 e GP6, com geração de um fragmento de 140pb aproximadamente. Uma amostra com câncer cervical HPV-positiva foi utilizada como controle positivo e uma amostra controle negativo foram utilizadas em todas as reações de PCR. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

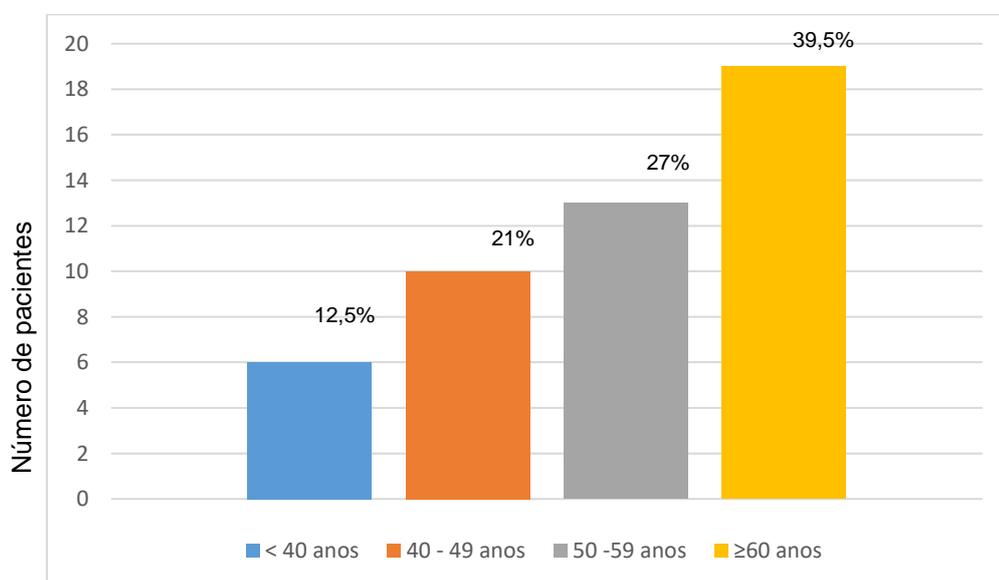
Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais. Para avaliar diferença significativa entre os percentuais das categorias da ocorrência HPV foi utilizado o teste Qui-quadrado em uma amostra e para verificar associação entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste Exato de Fisher. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5%. O programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

4 RESULTADOS

De acordo com a pesquisa realizada, foi identificado 54 casos de carcinoma mamário no ano de 2017 no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, 4 pacientes foram excluídas do estudo pois os blocos de biópsias não foram encontrados. As análises foram realizadas em 50 pacientes que apresentavam os critérios de inclusão necessários para participar da pesquisa, a média de idade das pacientes foi 55,70 anos +/- 13,20 e variou entre 31 e 94 anos.

Em relação a faixa etária das pacientes que participaram da pesquisa, a maior prevalência de diagnóstico do câncer mamário foi em mulheres com idade igual ou superior a 60 anos (Gráfico 1).

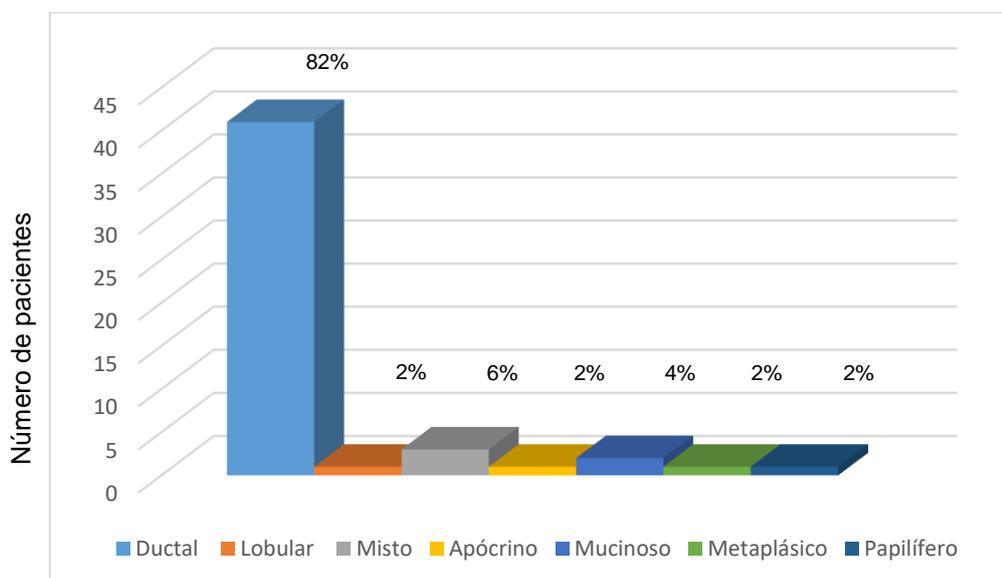
Gráfico 1. Frequência de idade de mulheres diagnosticadas com câncer de mama no setor de anatomia patológica do HC/UFPE no ano de 2017



Fonte: Autor

Foram identificados seis tipos histológicos de carcinoma mamário neste estudo, sendo carcinoma ductal, lobular, misto, apócrino, mucinoso, metaplásico e papilífero. O carcinoma ductal apresentou a maior prevalência com 41 mulheres diagnosticada com esse subtipo histológico de câncer mamário, representando 82% (41/50) (Gráfico 2).

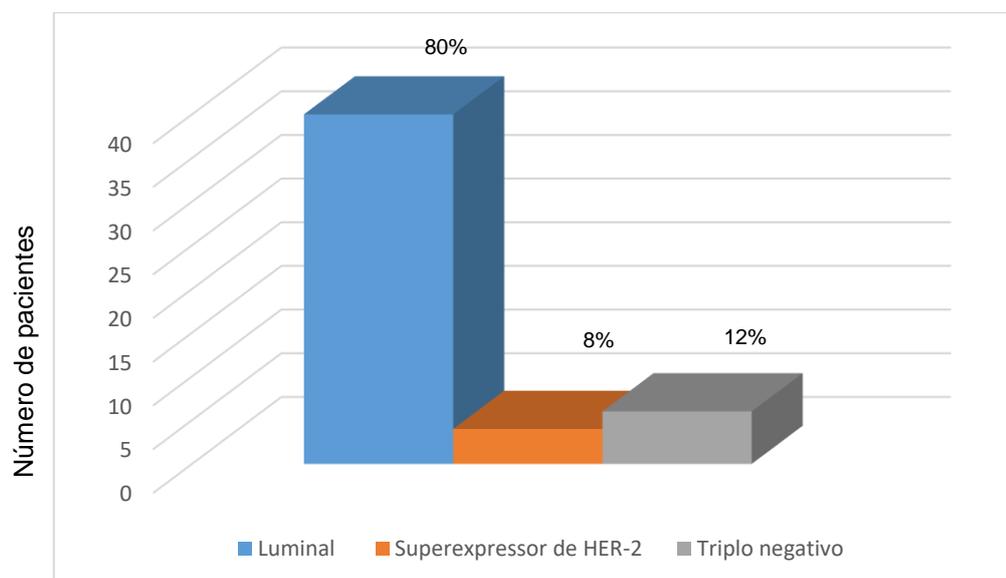
Gráfico 2. Classificação histológica dos tipos de câncer de mama de mulheres diagnosticadas no setor de anatomia patológica do HC/UFPE no ano de 2017.



Fonte: Autor

Na análise das mulheres participantes da pesquisa foi identificado 40 (80%) casos do tipo luminal, 6 (12%) triplo negativo, 4 (8%) superexpressor de HER2 (Gráfico 3). O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente encontrado na população analisada foi o luminal, que apresenta expressão de receptores hormonais teciduais para estrógeno e progesterona.

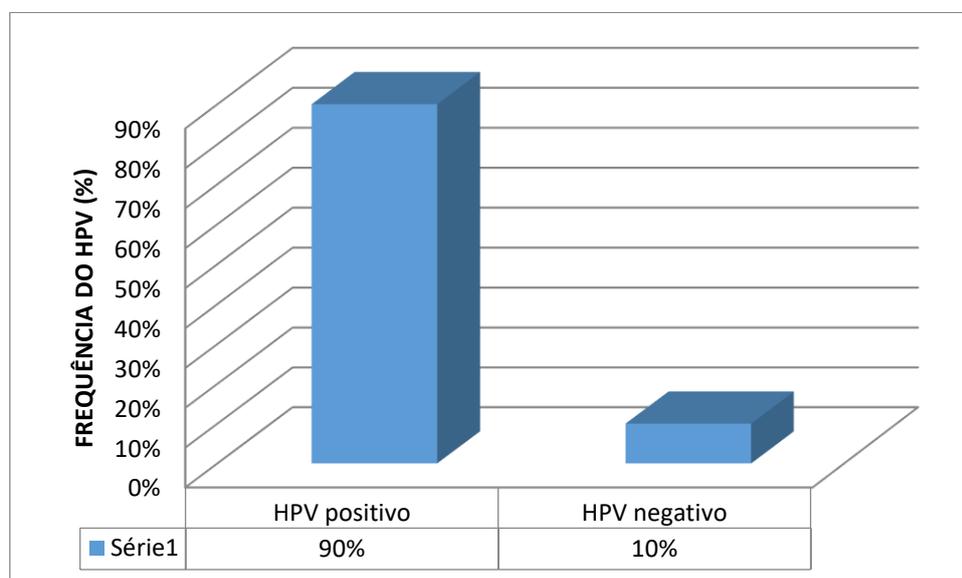
Gráfico 3. Classificação molecular do câncer de mama de mulheres diagnosticadas no setor de anatomia patológica do HC/UFPE no ano de 2017.



Fonte: Autor

Todas as amostras selecionadas são de tumores mamários invasivos que foram analisados quanto a presença ou ausência do vírus HPV, foi verificado a presença do HPV em 45 de 50 pacientes, representando 90% de prevalência do HPV em câncer de mama invasivo (Gráfico 4), percentuais estes que indicam diferenças significativas ($p < 0,001$).

Gráfico 4. Frequência do HPV no Câncer de mama invasivo de mulheres diagnosticadas no setor de anatomia patológica do HC/UFPE no ano de 2017.



Fonte: Autor

O câncer de mama foi mais frequente em mulheres na faixa etária de 60 anos ou mais (19/50), e o HPV também foi mais prevalente nessa faixa etária com 84% (16/19) (Tabela 1). As amostras foram analisadas quanto a presença ou ausência de metástase e sua correlação com o vírus HPV. O *Papillomavírus humano* foi encontrado em todos os tecidos tumorais que apresentaram metástase (18/18) e nos tumores que não apresentaram metástase sua prevalência foi de 84% (27/32), porém os resultados não apresentaram avaliação estatística significativas ($p=0,145$).

Foram identificados seis tipos histológicos de carcinoma mamário neste estudo, sendo carcinoma ductal, lobular, misto, apócrino, mucinoso, metaplásico e papilífero. O carcinoma ductal apresentou a maior prevalência com 41 mulheres diagnosticada com esse subtipo histológico e o HPV também foi mais prevalente nesse grupo com 88% (36/41) (Tabela 1).

O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente na população analisada foi o luminal, que apresenta expressão de receptores hormonais teciduais para estrógeno e progesterona. Sendo também o subtipo que apresentou maior prevalência do DNA viral encontrado em 93% (37/40) ($p=0,406$) (Tabela 2).

A verificação da prevalência do HPV de acordo com os marcadores moleculares foi mais encontrado no KI67 $\geq 14\%$ que apresentou 94% (30/32), ER 93% (38/41), PR 91% (29/32) e HER2 91% (10/11), por último o KI67 $< 14\%$ apresentou 83% (15/18), apesar da alta prevalência do HPV verificada nesta população a avaliação estatística não foi significativa (Tabela 2).

Tabela 1. Frequência do Papillomavírus humano relacionado as fatores clínico-patológicos em carcinomas de mama de mulheres diagnosticadas no setor de anatomia patológica do HC/UFPE no ano de 2017

	Todos os casos	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	p-value
Número de casos	50 (100%)	45 (90%)	5 (10%)	
	48 (100%)*			
Idade (anos)				
< 40 anos	6 (100%)	5 (83%)	1 (17%)	P ¹ = 0,614
40-49	10 (100%)	10 (100%)	0 (0%)	-
50-59	13 (100%)	12 (92%)	1 (8%)	
≥60 anos	19 (100%)	16 (84%)	3 (16%)	
Presença de metástase				
Metástase	18 (100%)	18 (100%)	0 (0%)	-
Não metástase	32 (100%)	27 (84%)	5 (16%)	P ¹ = 0,145
Classificação histológica				
Ductal	41 (100%)	36 (88%)	5 (12%)	P ¹ =1,000
Lobular	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	-
Misto	3 (100%)	3 (100%)	0 (0%)	-
Apócrino	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	-
Mucinoso	2 (100%)	2 (100%)	0 (0%)	-
Metaplásico	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	-
Papilífero	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)	-

¹ Através do teste Exato de Fisher

* No cálculo da distribuição por idade foram utilizadas informações de 48 pacientes

Fonte: Autor

Tabela 2. Frequência do Papillomavírus humano relacionado aos marcadores moleculares em carcinomas mamários de mulheres diagnosticadas no setor de anatomia patológica do HC/UFPE no ano de 2017

	Todos os casos N (%)	HPV positivo N (%)	HPV negativo N (%)	p-value
Número de casos	50 (100%)	45 (90%)	5 (10%)	
Classificação molecular				
Luminal	40 (100%)	37 (93%)	3 (7%)	P ¹ = 0,406
Superexpressor de HER2	4 (100%)	3 (75%)	1 (25%)	-
Triplo negativo	6 (100%)	5 (83%)	1 (17%)	-
Expressão ER				
Sim	41	38 (93%)	3 (7%)	P ¹ = 0,216
Não	9	7 (78%)	2 (2%)	
Expressão PR				
Sim	32	29 (91%)	3 (9%)	P ¹ =1,000
Não	18	16 (89%)	2 (11%)	
Expressão HER2				
Sim	11	10 (91%)	1 (9%)	P ¹ =1,000
Não	39	35 (90%)	4 (10%)	
KI67 <14%	18	15 (83%)	3 (17%)	P ¹ =1,000
KI67 ≥ 14%	32	30 (94%)	2 (6%)	

¹ Através do teste Exato de Fisher

Fonte: Autor

5 DISCUSSÃO

As pesquisas sobre a influência do HPV no câncer tem avançado a cada dia, sendo um tema muito investigado e debatido, os resultados tem demonstrado que o mecanismo de replicação viral do HPV interage com mecanismos moleculares e celulares de replicação das células causando desregulação e imortalização celular (PORNTHANAKASEM et al, 2001; ZUR HAUSEN, 2002; TERMINI,VILLA, 2008; DOORBAR, 2012; LAWSON, 2018).

Todas as amostras selecionadas neste estudo foram de tumores mamários invasivos onde observou-se que a média de idade das pacientes foi 55,7 anos e a maior prevalência de diagnóstico do câncer mamário foi em mulheres com idade igual ou superior a 60 anos, representando 39,5% das amostras. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Balci et al (2019) onde a idade média das mulheres com câncer de mama que participaram do seu estudo foi de 52 anos. também concordou com a idade média encontrada por Gonçalves (2016) que apresentou estudo com a idade média de 57,5 anos e a faixa etária onde houve maior frequência de carcinomas mamários foi nas mulheres com idade igual ou maior que 60 anos, Cavalcante et al (2018) também obteve resultados semelhantes a presente pesquisa onde sua população com câncer mamário apresentou a média de idade em 55,2 anos.

Os tumores foram classificados em seis tipos histológicos, sendo carcinoma ductal, lobular, misto, apócrino, mucinoso, metaplásico e papilífero. O carcinoma ductal apresentou a maior prevalência representando 82% dos diagnósticos histológicos de câncer mamário encontrados neste estudo, os dados também são concordantes com os resultados de Gonçalves (2016) e Khodabandehlou et al (2019).

Na classificação molecular dos tumores analisados na pesquisa foram identificados 40 (80%) casos do tipo luminal, 6 (12%) triplo negativo, 4 (8%) superexpressor de HER2. O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente encontrado na população analisada foi o luminal, que apresenta expressão de receptores hormonais teciduais para estrógeno e progesterona, os dados também são concordantes com os resultados de Gonçalves (2016).

Quando as amostras foram analisadas em relação a presença ou ausência do HPV, foi verificado a presença do vírus em 45 de 50 pacientes, representando 90% de prevalência do HPV nos cânceres de mama invasivo analisados, percentuais estes

que indicaram resultados significativo quanto a prevalência do HPV na população estudada ($p < 0,001$). Os resultados obtidos concordam com Wang e Zang (2017) que avaliaram mulheres chinesas com câncer de mama e obtiveram prevalência de HPV em 81% (52/64) das pacientes com carcinoma invasivo da mama, bem como, De Villiers e colaboradores (2005) que realizou pesquisa para HPV em mulheres nos Estados Unidos e observou uma prevalência de 86%, Lawson e colaboradores na Austrália (2016) que encontrou uma prevalência de HPV em 70% da sua população e Islam e colaboradores em 2017 analisaram mulheres com câncer de mama na Índia e detectaram o HPV em aproximadamente 65% das mulheres analisadas. Estudos realizados no Nordeste do Brasil identificaram uma prevalência menor de HPV quando comparados com o presente estudo, de acordo com Cavalcante e colaboradores (2018) em Fortaleza, Ceará, identificaram uma prevalência de HPV em 49,5% em mulheres com câncer de mama e Gonçalves (2016) em Recife, Pernambuco, observou uma prevalência de 46,7% de HPV em carcinomas mamários.

De acordo com estudos recentes a prevalência do HPV pode variar de 0 a 86% de acordo com a população analisada, região geográfica e metodologia utilizada (LAWSON, 2018; KHODABANDEHLOU, 2019). Estudos demonstraram que a frequência do HPV em tecidos tumorais de mama é cerca de quatro vezes maior do que em tecidos mamários benignos, esses resultados apontam que a infecção viral está associada a um aumento do risco de câncer de mama (BAE, KIM, 2016; LAWSON, 2016, GONÇALVES, 2016; CAVALCANTE et al., 2018)

A prevalência do HPV e os tipos virais podem variar de acordo com a região geográfica e essa variação pode resultar em capacidade oncogênica diferenciada de acordo com a população. na maioria dos estudos encontrados os tipos virais de alto risco são os mais encontrados, sendo mais frequente o tipo 16, seguido do 18, 33 e 58. Os HPVs de alto risco apresentam grande capacidade de alteração celular através da atuação das oncoproteínas E6 e E7 principalmente (DAMIN et al, 2004; LAWSON, 2016; DELGADO-GARCIA, 2017; ISLAM et al, 2017)

O tipo de metodologia utilizada também pode influenciar nos resultados pois existe variação entre a sensibilidade e a especificidade dentre as técnicas utilizadas, atualmente a metodologia que apresenta melhores resultados para pesquisa de HPV é a PCR (Reação em cadeia de polimerase), pois sabe-se que a carga viral do HPV na mama é menor em relação a outros tecidos e a PCR tem a capacidade de

amplificação do DNA viral, aumentando assim a possibilidade de identificação do material genético viral (LAWSON,2016; LAWSON, 2018).

Quando correlacionamos a frequência do HPV com a faixa etária no nosso estudo foi observado que a maior prevalência foi nas mulheres com idade maior que 60 anos (16/19). Os resultados foram concordantes com Gonçalves (2016) que também observou no seu estudo que a faixa etária onde o HPV apresentou-se mais frequente foi nas mulheres acima de 60 anos. e concordam também com os achados de Cavalcante et al (2018) que observou maior prevalência em mulheres acima dos 51 anos.

O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente na população analisada foi o luminal, que apresenta expressão de receptores hormonais teciduais para estrógeno e progesterona. Sendo também o subtipo que apresentou maior prevalência do DNA viral encontrado, Luminal 93% (37/40) ($p=0,406$), o subtipo superexpressor de HER2 apresentou infecção por HPV em 75% (3/4) e o triplo negativo 83% (5/6), os dados encontrados concordam com Gonçalves (2016). O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente na população analisada foi o luminal, que apresenta expressão de receptores hormonais teciduais para estrógeno e progesterona. A verificação da prevalência do HPV de acordo com os marcadores moleculares foi mais encontrado no KI67 $\geq 14\%$ que apresentou 94% (30/32), seguido do ER 93% (38/41), PR 91% (29/32) e HER2 91% (10/11), por último o KI67 $< 14\%$ apresentou 83% (15/18), apesar da alta prevalência do HPV verificada nesta população a avaliação estatística não foi significativa. Os resultados encontrados assemelham-se aos encontrados por Gonçalves (2016) que verificou alta prevalência de HPV em tecidos positivos para o receptor de estrógeno (ER). Segundo Lawson e Heng (2010) os hormônios esteróides aumentam a transformação epitelial quando associados ao HPV e outros estudos afirmam que a imortalização celular pode aumentar cerca de 30 vezes após essa combinação. A influência do hormônio estrogênio associado a oncogênese do HPV é relevante para o câncer de mama pois é um tumor hormônio dependente, o que justifica a alta prevalência de HPV nos tecidos positivos para receptores de estrógenos (KHAN et al, 1997; WEBSTER et al, 2001). Outro marcador molecular que apresenta associação com o microrganismo HPV é o gene HER2 que é encontrado em cerca de 15 a 20% dos casos de câncer de mama invasivos, de acordo com alguns estudos foi observado a associação entre

o HPV de alto risco e o gene HER2 está relacionada um tipo tumoral mais agressivo (AL MOUSTAFA et al., 2004; YASMEEN et al., 2007; BARROS,LEITE, 2015). Estudos demonstram ainda que células que apresentavam superexpressão de HER2 e as oncoproteínas E6/E7 obtiveram maior transformação de células tumorais. Observaram também que a associação HER2/E6/E7 atuam sobre a e-caderina e catenina em carcinomas humanos, a co-expressão dessa associação diminui a expressão da E-caderina e catenina e promove a ativação da β -catenina que modula a transcrição celular, promovendo o crescimento descontrolado das células (AL MOUSTAFA et al., 2004; YASMEEN et al., 2007; AL MOUSTAFA et al., 2008). A associação do HPV com a classificação molecular não apresentou valores estatisticamente significativos entre os diferentes marcadores, no entanto é possível observar que a presença do vírus nesses pacientes pode agravar a neoplasia.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que o tipo histológico mais prevalente foi o carcinoma ductal;
- A prevalência do HPV foi alta nos carcinomas invasivos;
- O câncer de mama foi mais frequente em mulheres na faixa etária acima de 60 anos e o HPV também foi mais prevalente nessa faixa etária; O Papillomavírus humano foi encontrado em todos os tecidos tumorais das pacientes que desenvolveram metástase.
- O subtipo molecular de câncer de mama mais prevalente foi o luminal. Sendo também o subtipo que apresentou maior prevalência do DNA viral.
- O HPV está presente em grande parte das amostras de tumores de mama avaliadas neste estudo e em outras pesquisas. Apesar da variação entre a prevalência do HPV nos estudos analisados é possível observar que quando avaliado a prevalência do microrganismo de alto risco e comparado com genes e moléculas de regulação do ciclo celular é possível verificar que as células apresentam maior percentual de alterações neoplásicas e imortalização celular.

6.1 PERSPECTIVAS

- É importante a realização da tipificação viral, com objetivo de associar os tipos virais mais encontrados nessa população.
- É importante comparar a prevalência do HPV em tecidos benignos provenientes de cirurgia plástica mamária com a prevalência de tecidos neoplásicos.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2017**. Atlanta, 2017. Disponível em: <<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>>. Acesso em: 07 ago. 2019.
- ANTONSSON, A.; SPURR, T.P.; CHEN, A.C.; FRANCIS, G.D.; MCMILLAN, N.A.; SAUNDERS, N.A.; LAW, M.; BENNETT, I.C. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. **Journal of Medical Virology**, 83, 2157–2163. 2011.
- BAE, J.M.; KIM, E.H. Human papillomavirus infection and risk of breast cancer: a meta-analysis of case-control studies. **Infect Agent Cancer** 11:14. 2016.
- BALCI, F. L.; URAS, C.; FELDMAN, S.M. Is Human Papillomavirus Associated with Breast Cancer or Papilloma presenting with Pathologic Nipple Discharge? **Cancer Treatment and Research Communications**. 2019.
- BARROS, A.C.S.D.; LEITE, K.R.M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**.;25(4):146-55. 2015.
- BRASIL. Ministério da saúde. **Diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em:** http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Deteccao_precoce_CANCER_MAMA_INCA.pdf acessado em: 08/08/19
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância.** – Rio de Janeiro: INCA, 2018a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf> Acessado em: 07/08/19
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **A mulher e o câncer de mama no Brasil.** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva,

Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância, Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede – 3. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: INCA, 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer no Brasil: dados dos registros do sistema único de saúde**. 2019; Rio de Janeiro: INCA; Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acessado em: 07/08/19

BRAY, F.; FARLEY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, L.A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS**. 0:1–31.2018.

BIANCHINI, G.; BALKO, J.M.; MAYER, I.A.; SANDERS, M.E.; GIANN, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nature Reviews | Clinical Oncology**. 13, 677. 2016.

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.; 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**;73:e465. 2018.

CHANG, Y.J.; CHEN, H.C.; PAN, M.H.; LEE, B.H.; YOU, S.L.; LIN, C.Y. Intratypic variants of human papillomavirus type 16 and risk of cervical neoplasia in Taiwan. **Journal of Medical Virology** 85(9):1567±76. 2013.

COELHO, A.S.; SANTOS, M.A.S.; CAETANO, R.I.; PIOVESAN, C.F.; FIUZA, L.A.; MACHADO, R.L.D.; FURINI, A.A.C. Predisposição hereditária ao câncer de mama e sua relação com os genes BRCA1 e BRCA2: revisão da literatura. **REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS**;50(1):17-21. 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** 84: 131–137, 2004.

DAUDT, C.; DA SILVA, F.; STRECK, A.F.; WEBER, M.N.; MAYER, F.Q.; CIBULSKI, S.P.; CANAL, C.W. How many papillomavirus species can go undetected in papilloma lesions? **Scientific reports**. 6. 2016.

DE FREITAS, A.C.; GURGEL, A.P.; CHAGAS, B.S.; COIMBRA, E.C.; DO AMARAL C.M. Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecologic Oncology**, 4. 2012.

DELGADO-GARCIA, S.; MARTÍNEZ-ESCORIZA, J.C.; ALBA, A.; MARTÍN-BAYÓN, 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 (BMC) CANCER**.17:320. 2017.

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.**, 7, R1–R11. 2005.

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**, 30 Suppl 5, F55–70.2012.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, 7, 3863-3890; 2015.

FADOUKHAIR, Z.; ZARDAVAS, D.; CHAD, M.A.; GOULIOTI, T.; AFTIMOS, P.; PICCART, M. Evaluation of targeted therapies in advanced breast cancer: the need for large-scale molecular screening and transformative clinical trial designs. **Oncogene.**;1- 7, 2015.

FERRO, A.B. **Imunocitoquímica**. Instituto Politécnico de Lisboa - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. Licenciatura em Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica. 2010.

FERNANDES, J.V.; ARAÚJO, J.M.G.; FERNANDES, T.A.A.M. Biology and natural history of human papillomavirus infection. **Journal of Clinical Trials**, 1–12. 2015.

GANNON, O.M.; ANTONSSON, A.; MILEVSKIY, M.; BROWN, M.A.; SAUNDERS, N.A.; BENNETT, I. No association between HPV positive breast cancer and expression of human papilloma viral transcripts. **Scientific Reports**. v.5 (1). p.327-345. 2015.

GLENN, K.W.; WHITAKER, N.J.; LAWSON, J.S. High risk human papillomavirus and Epstein Barr virus in human breast milk. **BIOMED CENTRAL (BMC) Cancer Research notes** . v.5. p.477. 2012.

GLOBOCAN. Cervical Cancer, **Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. IARC. Disponível em:
<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 4; n. 6; p. 463-474. 2012.

GONÇALVES, E. **Detecção e análise do Papilomavírus humano (HPV) em carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil**. Recife: Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

GUIMARÃES, J.R. **Manual de oncologia**. 3ª ed. São Paulo: Bbs Farmacêutica, 2008.

GURGEL, A.P.A.D.; CHAGAS, B.S.; AMARAL, C.M.M.; ALBUQUERQUE, E.M.B.; SERRA, I.G.S.S.; SILVA NETO, J.C.; MUNIZ, M.T.C.; FREITAS, A.C. Prevalence and Genetic Variability in Capsid L1 Gene of Rare Human Papillomaviruses (HPV) Found in Cervical Lesions of Women from North-East Brazil. **BioMed Research International**. v. 2013 (8). p. 1-7. 2013.

GURGEL, M.M.S. **Câncer de mama: estágio no momento do diagnóstico em mulheres residentes do Recife Pernambuco**. Recife: Monografia do Programa de Residência multiprofissional em Saúde coletiva do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz. 2011. Disponível em:
<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2011gurgel-mms.pdf>

HENG, B.; GLENN, W.K.; YE, Y.; 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.

HONDERMARCK, H.; TASTET, C.; YAZIDI-BELKOURA, I.; TOILLON, R.; LE BOURHIS, X. Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. **Journal of Proteome Research**, v.7, p.1403–1411. 2008.

ISLAM, S.; DASGUPTA, H.; ROYCHOWDHURY, A.; BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, N.; ROY, A. Study of association and molecular analysis of human papillomavirus in breast cancer of Indian patients: Clinical and prognostic implication. **PLOS ONE**. v.12(2). p.1-17. 2017.

JOHNSON, K.M.; KINES, R.C.; ROBERTS, J.N.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T.; DAY, P.M. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **Journal of virology**, v. 83, n. 5, p. 2067–2074. 2009.

KHODABANDEHLOU, N; MOSTAFAEI, S; ETEMADI, A; GHASEMI, A; PAYANDEH, M; HADIFAR, S; NOROOZNEZHAD, A.H; KAZEMNEJAD, A; MOGHOOFEI, M. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. **BIOMED CENTRAL (BMC) Cancer**. v.19. p.61. 2019.

KHAN, M.A.; CANHOTO, A.J.; HOUSLEY, P.R.; CREEK, K.E.; PIRISI, L. Glucocorticoids stimulate growth of human papillomavirus type 16 (HPV16)-immortalized human keratinocytes and support HPV16-mediated immortalization without affecting the levels of HPV16 E6/E7 mRNA. **Experimental Cell Research**.v. 236, p. 304–310. 1997.

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K.; HENG, B.Y.; TRAN, B.; LUTZE-MANN, L.; WHITAKER, N.J. Koilocytes indicate a role for human papilloma virus in breast Câncer. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins **British Journal of Cancer**. V.101, n.8, p. 1351 – 1356. 2009.

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K.; SALYAKINA, D.; DELPRADO, W.; CLAY, R.; ANTONSSON, A. Human papilloma viruses and breast cancer. **Frontiers on Oncology**. v 5. p .277. 2015.

LAWSON, J.S.; HENG, K.B.; WHITAKER, N.J. Human Papilloma Virus Identification in breast cancer patients with previous cervical neoplasia. **Frontiers on Oncology**. V.5.p.298. 2016.

LAWSON, J.; HENG, K.B. Viruses and Breast Cancer. **Cancers**, v.2, p.752-772; 2010.

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 on Oncology**. V.8(1). p.1-18. 2018.

LI, J.; DING, J.; ZHAI, K. Detection of Human Papillomavirus DNA in Patients with Breast Tumor in China. **PLoS ONE** v.10(8). P.e0136050.. 2015.

LIANG, W.; WANG, J.; WANG, C.; LV, Y.; GAO, H.; ZHANG, K. Detection of high-risk human papillomaviruses in fresh breast cancer samples using the hybrid capture 2 assay **Journal of Medical Virology**. V.85 p.2087–92. 2013.

MEATTINI, I.; BICCHIERAI, G.; SAEVA, C.; BENEDETTO, D, DESIDERI, I, BECHERINI, C. Impact of molecular subtypes classification concordance between preoperative core needle biopsy and surgical specimen on early breast cancer management: Single-institution experience and review of published literature. **The journal of cancer surgery. European Journal Surgical Oncology** v.43 (4).p.642-648. 2016.

MIGOWSKI, A.R.N.; SILVA, G.A.E.;DIAS, M.B.K.; DIZ, M.P.E.;, SANT'ANA, D.R.; NADANOVSKY, P. Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil. II - Novas recomendações nacionais, principais evidências e controvérsias. *Cadernos de Saúde Pública*, 34(6), 21, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2018000600502&lng=en&nrm=iso . Acessado em: 08/08/ 2019.

MOODY, CA.; LAIMINS, LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews. Cancer**, v.10(8), p.550–60. 2010.

OHBA, K.; ICHIYAMA, K.; YAJIMA, M.; GEMMA, N.; NIKAIDO, M.; WU, Q.; CHONG, P.; MORI, S.; YAMAMOTO, R.; WONG, J.E.; 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.23;9(5)p.e97787. 2014.

PERNAMBUCO. Secretaria de Saúde do Recife, Secretaria Executiva de Coordenação Geral, **Plano Municipal de Saúde 2018 – 2021**. Disponível em: http://www2.recife.pe.gov.br/sites/default/files/plano_municipal_de_saude_2018-2021_4.pdf. acessado em: 08/08/2019

PORNTHANAKASEM, W.; SHOTELERSUK, K.; TERMRUNGRUANGLERT, W.; VORAVUD N, NIRUTHISARD S, MUTIRANGURA A. Human papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical cancer. **BIOMED CENTRAL (BMC) Cancer**;v.1p.2. 2001.

QUREISHI A.L.; MAWBY, T.; FRASER, L.; SHAH, K.A.; MOLLER, H.; WINTER, S. Current and future techniques for human papilloma virus (HPV) testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**.V. 274(7), p. 2675–2683. 2017.

RAKHA, E.A.; GREEN, A.R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**; v.49(2), p. 111–119. 2017.

RINTALA, M.A.; GRÉNMAN, S.E.; PURANEN, M.H.; ISOLAURI, E.; EKBLAD, U.; KERO, P.O.; SYRJÄNEN, S.M. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. **Journal Clinical of Microbiology**.v.43(1). p.376-81. 2005.

RYSKA, A. Molecular pathology in real time. **Cancer Metastasis Reviews**.v.35 (1).p.129-140. 2016

SERRA, K.P.; RAMALHO, S.; TORRESAN, R.; VASSALLO, J.; SARIAN, L.O.; SILVA, G.R.; DERCHAIN, S. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**. V.36(12).p. 575-80.2014.

SILVA, E.D.C.; SMANIOTO, R.; CAMPOS, S. F.; HASS, P. Papilomavírus Humano. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**.;v.36.p.137-142. 2004.

SILVA, A.B.A. **conhecimento e acesso aos exames para detecção precoce do câncer de mama: o caso das mulheres residentes no distrito sanitário III, RECIFE, PE**. Recife: Monografia do Programa de Residência multiprofissional em Saúde coletiva do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz. 2011. Disponível em: <http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2011silva-aba.pdf>

SERRA KP, RAMALHO S, TORRESAN R, VASSALLO J, SARIAN LO, SILVA GR, DERCHAIN S. Nova classificação dos carcinomas da mama:procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**.; v.36(12)p.575-80. 2014.

SIMÕES, P.W.; MEDEIROS, L.R.; PIRES, P.D.S.; EDELWEISS, M.I.; ROSA, D.D.; SILVA, F.R.; ROSA, M.I. Prevalence of Human Papillomavirus in Breast Cancer A Systematic Review. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.22(3), p.343–347. 2012.

STANLEY, M.A.; PETT, M.R.; COLEMAN N. HPV: from infection to cancer. **Biochemical Society transactions.**; v.35(Pt 6).p.1456–60. 2007.

TERMINI, L.; VILLA, L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 125–131, 2008.

UICC, INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER. **TNM classification of malignant tumours 8th edition**. 2017. Disponível em: http://www.swscn.org.uk/wp/wp-content/uploads/2014/08/TNM8_changes.pdf acessado em: 10 de agosto de 2019.

VUONG, D.; SIMPSON, P.T.; GREEN, B.; CUMMINGS, M.C.; LAKHANI S.R. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**. V. 465 (1), p. 1–14. 2014.

WANG, Y.W.; ZHANG, K.; ZHAO, S.; LV, Y.; ZHU, J.; LIU, H.; FENG, J.; LIANG, W.; MA, R.; WANG, J. HPV Status and Its Correlation with BCL2, p21, p53, Rb, and Survivin Expression in Breast Cancer in a Chinese Population. **BIOMED CENTRAL BioMed Research International**. v.2017. p.1-7 2017.

WEBSTER, K.; TAYLOR, A.; GASTON, K. O. Estrogen and progesterone increase the levels of apoptosis induced by the human papillomavirus type 16 E2 and E7 proteins. **The Journal of General Virology**. V.82. p.201–213. 2001.

WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy. **Nature reviews Clinical Oncology**, v.6. p. 718-730. 2009.

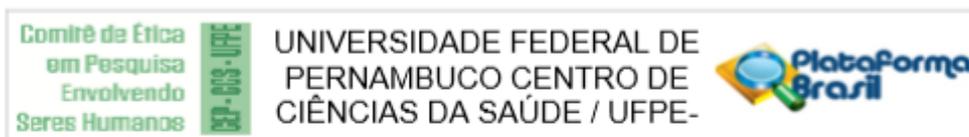
WINSLOW, T. Medical and scientific illustration. 2013. Disponível em: <https://www.teresewinslow.com/breast/5cfyggq3a1tvi8s0ps7uo25fn9guuq5> Acesso em: 08-08-2019

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.2038–42. 2007.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, p.690–698. 2000.

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

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Jacinto da Costa Silva Neto

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 28508614.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 798.811

Data da Relatoria: 26/09/2014

Apresentação do Projeto:

A EMENDA foi apresentada para modificação da metodologia da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Solicita a modificação da metodologia da pesquisa, incluindo a carta de anuência do Setor de Patologia da HC/UFPE e do Hospital Barão de Lucena

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A EMENDA apresentada está adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão adequados.

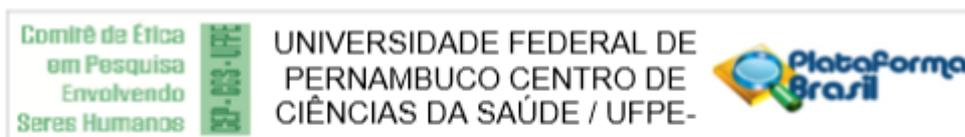
Recomendações:

s/recomendação;

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 798.811

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da EMENDA em questão e o pesquisador está autorizado a modificar a metodologia e a inclusão das cartas de anuência;

RECIFE, 21 de Setembro de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)