



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

ELAYNE INTERAMINENSE CAVALCANTI DE BRITO AZEVEDO

**ANÁLISE DE VIABILIDADE DA DETECÇÃO DE HPV POR PCR
CONVENCIONAL EM AMOSTRAS PARAFINADAS DE CORE BIÓPSIA
MAMÁRIA**

Recife
2023

ELAYNE INTERAMINENSE CAVALCANTI DE BRITO AZEVEDO

**ANÁLISE DE VIABILIDADE DA DETECÇÃO DE HPV POR PCR
CONVENCIONAL EM AMOSTRAS PARAFINADAS DE CORE BIÓPSIA
MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Coorientador: Prof. Dr. Giwellington Silva Albuquerque

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Azevedo, Elayne Interaminense Cavalcanti de Brito

Análise de viabilidade da detecção de HPV por PCR convencional em amostras parafinadas de core biópsia mamária/ Elayne Interaminense Cavalcanti de Brito Azevedo– 2023.

40 f. : il., fig., tab.

Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto

Coorientador: Giwellington Silva Albuquerque

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia, Recife, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Cancer de Mama 2. Papilomavírus humano 3. PCR I. Silva Neto, Jacinto da Costa (orient.) II. Albuquerque, Giwellington Silva (coorient.) III. Título

616.99449

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -183

ELAYNE INTERAMINENSE CAVALCANTI DE BRITO AZEVEDO

**ANÁLISE DE VIABILIDADE DA DETECÇÃO DE HPV POR PCR
CONVENCIONAL EM AMOSTRAS PARAFINADAS DE CORE BIÓPSIA
MAMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em morfotecnologia. Área de concentração: Morfotecnologia.

Aprovado em: 05/05/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ PPGM

Prof.ª Dra. Ivone Antônio de Souza (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ PPGM

Prof.ª Dra. Fernanda das Chagas Ângelo mendes Tenório (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ PPGM

Prof. Dr. Marconi Rego Barros Junior (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/ Departamento de Genética - CB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu forças e ajudou a superar cada obstáculo, ao meu querido esposo Pedro, por toda paciência, amparo, amor e incentivo durante esse projeto acadêmico. Ao meu pai José que enquanto em vida me ensinou o valor e importância de buscar por conhecimento, e a minha mãe Joseane por todo seu apoio. Sou grata ao meu orientador Prof^o Jacinto da Costa Silva Neto pela confiança e oportunidades de aprendizado e ao meu co-orientador Prof. Dr. Giwellington Silva Albuquerque por todo apoio. Agradeço também aos meus queridos amigos e colegas Maxwelline, Juliano, Romildo, Ícaro e Karina que me ajudaram a enfrentar os desafios encontrados durante a pesquisa, vocês foram essenciais e inestimáveis. Aproveito a oportunidade para agradecer gentilmente a coordenação do programa e banca examinadora pela disponibilidade, compreensão e atenção em contribuir com o fechamento deste ciclo.

RESUMO

O câncer de mama é uma doença complexa e multifatorial que mais acomete mulheres em todo mundo. Apesar de ser bem elucidada os fatores de risco associados a carcinogênese mamária, sua etiopatologia ainda não está bem definida. Pesquisas de análises de associação viral com a carcinogênese mamária estão sendo conduzidas, sendo o Papilomavírus Humano de Alto Risco (HPV-HR) um dos vírus estudados. Assim, o presente estudo teve como objetivo analisar a viabilidade de detecção de HPV por meio da técnica de PCR convencional em amostras parafinadas de core biópsia de mama. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo observacional. Foi feita a extração de DNA de 60 blocos parafinados de core biópsia mamária provenientes do Hospital das Clínicas da UFPE, de 2018 a 2022. Dessas amostras 32 foram excluídas devido a quantidade de material genético extraído ser considerada baixa (abaixo de 19 monogramas), as 28 amostras restantes foram submetidas a detecção de do DNA de HPV por PCR convencional utilizando os primers GP5+/GP6+. Não foi possível detectar DNA de HPV nessas amostras, alguns fatores como o processamento histopatológico das amostras, o processo de extração de DNA, primers utilizados. São necessários mais estudos utilizando outros primers consenso presença do HPV no câncer de mama, um maior número de amostras, bem como o aprimoramento das técnicas utilizadas para otimizar os resultados.

Palavras-chave: Câncer de mama; HPV; GP5+/GP6+; Detecção.

ABSTRACT

Breast cancer is a complex and multifactorial disease that most affects women worldwide. Although the risk factors associated with breast carcinogenesis are well elucidated, its etiopathology is still not well defined. Research on analyzes of viral association with breast carcinogenesis are being conducted, with the High-Risk Human Papillomavirus (HPV-HR) being one of the viruses studied. Thus, the present study aimed to analyze the feasibility of detecting HPV using the conventional PCR technique in paraffin-embedded breast core biopsy samples. This is an observational retrospective cross-sectional study. DNA was extracted from 60 paraffin-embedded breast core biopsy blocks from the Hospital das Clínicas da UFPE, from 2018 to 2022. Of these samples, 32 were excluded due to the amount of genetic material extracted being considered low (below 19 monograms), the The remaining 28 samples were subjected to detection of HPV DNA by conventional PCR using GP5+/GP6+ primers. It was not possible to detect HPV DNA in these samples, due to some factors such as the histopathological processing of the samples, the DNA extraction process, primers used. More studies are needed using other consensus primers on the presence of HPV in breast cancer, a larger number of samples, as well as the improvement of the techniques used to optimize the results.

Keywords: Breast Cancer; HPV; GP5+/GP6+; Detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes:2023	14
Figura 2 -	Genoma do HPV	18
Figura 3 -	Micrótomo e blocos parafinados de core biópsia mamária	25
Figura 4 -	Gel de PCR: HPV primers GP5+/ GP6+ Grupo Controle Fibroadenoma	27
Figura 5 -	Gel de PCR de HPV primers GP5+/GP6+ Grupo Teste Carcinoma	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões moleculares clássicos do câncer de mama por Imunohistoquímica	17
Tabela 2 - Amostras parafinadas de core biópsia mamária selecionadas	24
Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
E6/E7	Proteínas virais da região precoce do HPV
ER	Receptor de Estrogênio
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HPV	Papilomavírus Humano
HR-HPV	Papilomavírus Humano de alto risco
HSPGs	Proteoglicanos de sulfato de heparina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1/L2	Proteínas tardias do HPV
OMS	Organização mundial de saúde
pb	Pares de Base
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
p53	Proteína de mama de 53 kda, supressora de tumor
PR	Receptor de Progesterona
pRB	Proteína Retinoblastoma
RT- PCR	Reação em cadeia da Polimerase em tempo real
TN	Padrão molecular triplo negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	CÂNCER DE MAMA	14
2.2	O HPV	17
2.3	HPV E O CÂNCER DE MAMA	19
3	OBJETIVOS	21
3.1	OBJETIVOS GERAIS	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	TIPO DE ESTUDO	22
4.2	ASPECTOS ÉTICOS	22
4.3	LOCAL DE ESTUDO E ORIGEM DAS AMOSTRAS	22
4.3.1	Coleta, fixação e processamentos histopatológicos das amostras	22
4.3.2	Resgate dos laudos histopatológicos e dos blocos de parafinados de core biópsia mamária	23
4.4	MATERUAL DE ESTUDO	24
4.4.1	Critérios de inclusão	24
4.4.2	Critérios de exclusão	24
4.5	ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	25
4.5.1	Extração de DNA para detectar HPV	26
4.5.2	Detecção do DNA de HPV por PCR convencional	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
	REFERÊNCIAS	31
	ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA	35
	ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	39

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres no mundo, em 2020 foi o tipo de câncer de maior incidência e a causa mais comum de morte por câncer em mulheres (GLOBOCAN, 2020). A incidência e a mortalidade aumentaram nos países em desenvolvimento (SHAOYUAN LEI et al., 2021). No Brasil o câncer de mama em mulheres também ocupa o 1º lugar no ranking de incidência, excluindo o câncer de pele não melanoma (INCA,2023).

Vários fatores de risco estão associados ao câncer mama como por exemplo o avanço da idade, nuliparidade, obesidade, mutação dos genes BCRA1 e BCRA2 entre outros (MINAMI et al., 2019; INCA, 2022). Quando diagnosticado precocemente o tratamento e prognósticos são favorecidos (GOLÇALVES et al., 2017).

O diagnóstico do carcinoma mamário é constituído pelo exame clínico, exame de imagem e fechado pela análise histopatológico da lesão. A técnica de core biópsia é padrão ouro para o diagnóstico de lesões (HARBECK, 2016; KLIMBERG et al., 2016).

Por ser uma patologia complexa com alto grau de heterogeneidade intertumoral e intratumoral, é necessária uma abordagem personalizada para cada caso de câncer de mama. A classificação de seus subtipos é feita pela histopatologia e complementada pela patologia molecular (YEO e GUAN, 2017).

Existem mais de 20 tipos histológicos diferentes de câncer de mama, a maioria dos casos são classificados como de nenhum tipo especial (NST), o mais comum é o carcinoma ductal infiltrante, nenhum tipo especial (IDC-NST). A determinação do imunofenótipo da doença é fundamental para o tratamento e prognóstico. O ER (receptor de estrogênio), PR (receptor de progesterona) e HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), são os marcadores mais utilizados (TSANG et al., 2020; WILEY et al.,2020).

Quatro padrões moleculares clássicos são os mais frequentes nos casos de carcinoma mamário: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER2, Triplo negativo (FRAGOMENI et al., 2018). Apesar de esclarecido alguns fatores riscos associados a doença, sua etiopatologia ainda não está bem definida (SUN, 2017). A hipótese que alguns vírus podem estar associados a carcinogênese mamária vem sendo estudada, o papilomavírus humano (HPV) é um dos vírus estudados (JOSIH, 2012; KOULORA, 2018; LAWSON, 2018).

O HPV é um vírus de DNA circular epiteliotrófico encerrado em um capsídeo icosaedro, possui três regiões funcionais: Early (E) que codifica proteínas precoces E1- E7, região tardia ou late (L), que codifica duas proteínas tardias L1 e L2, e uma região regulatória LCR (DURZYNSKA et al., 2016). Cerca de 200 variantes de HPVs foram caracterizados são subdivididos em HPV de alto risco (HR -HPV) ou HPV de baixo risco (LR- HPV), dependendo de sua patogenicidade e propensão para desenvolver alterações malignas no hospedeiro (LIMA et al., 2016).

A associação do HPV de alto risco com outros tipos de neoplasias como o câncer cervical, anogenital e o câncer de cabeça e pescoço também está estabelecida (SERRANO, 2018). A infecção persistente por HR- HPV e a falta de uma resposta imune inata e adaptativa apropriada do hospedeiro corrobora para o desenvolvimento de lesões malignas segundo o modelo do câncer cervical (FERA et al., 2021).

O HPV infecta a célula basal que se torna reservatório do DNA viral, mantido em forma epissomal em baixo número. Posteriormente o vírus se integra ao genoma do hospedeiro, as proteínas E6 e E7 inibem as proteínas supressoras de tumor das células hospedeiras estimulando sua proliferação (BHATTACHARJEE et al., 2022).

A possível correlação do HPV na carcinogênese mamária não está definida, contudo células do tecido mamário contendo DNA de HPV foram identificadas ao redor do carcinoma (MALHONE et al, 2018). Estudos relatam a infecção pelo HPV nocâncer de mama, contudo a frequência do HPV encontrada variou amplamente (ISLAM et al., 2020). A presença do HPV no câncer de mama apresenta inconsistências e não está esclarecido como acontece a infecção no tecido mamário, mais estudos são necessários (KUDELA et al., 2022).

Diante do exposto o presente estudo avaliou a viabilidade de detecção de HPV por meio da técnica de PCR convencional em amostras benignas e malignas de core biópsia mamária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres no mundo, em 2020 foi o tipo de câncer de maior incidência e a causa mais comum de morte por câncer em mulheres. Representou 24,5% de todos os casos de câncer e 15,5% das mortes por câncer, sendo a 5ª causa de morte por câncer no mundo (IARC, 2023). A incidência e a mortalidade aumentaram nos países em desenvolvimento (SHAOYUAN LEI et al., 2021).

No Brasil o câncer de mama em mulheres também ocupa o 1º lugar no ranking de incidência, excluindo o câncer de pele não melanoma. A estimativa de novos casos para o triênio de 2023 a 2025 é de 73.610 casos (Figura 1), o equivalente a um risco estimado de 66,54 casos novos a cada 100 mil mulheres. É a neoplasia maligna mais incidente no país e em todas as Regiões brasileiras, sendo o maior risco apresentado na Região Sudeste, 84,46 casos novos por 100 mil mulheres, e o menor na Região Norte, 24,99 casos novos por 100 mil mulheres (INCA,2023).

Figura 1 - Estimativa dos tipos de câncer mais incidentes: 2023
Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 em mulheres no Brasil, exceto pele não melanoma



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
	Cólon e reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
	Glândula tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Adaptado de INCA (2023).

O câncer de mama é uma doença multifatorial em que vários fatores de risco estão correlacionados com o seu desenvolvimento e/ou progressão (KASHYAP et al., 2022). O avanço da idade, além do sexo, é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença, devido ao acúmulo de alterações biológicas que vem com o envelhecimento (SUN, 2017, ARSHI et al., 2018). Outros fatores de risco estão correlacionados com a carcinogênese mamária, de forma genérica, se agrupam em: fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais, fatores genéticos/hereditários (INCA, 2022).

Os fatores de risco endócrinos se correlacionam principalmente ao estímulo do hormônio estrogênio, seja endógeno ou exógeno. Mulheres nulíparas tendem a ter um maior risco de desenvolver a doença. O uso de progesterona e estrogênio como terapia de reposição hormonal para menopausa também aumenta o risco de desenvolver a doença. (MINAMI et al., 2019).

Em relação aos fatores de risco ambientais/comportamentais estão incluídos a ingestão de bebidas alcoólicas, sobrepeso/obesidade, inatividade física, exposição à radiação ionizante (SUN, 2017). O tabagismo é o fator mais controverso, atualmente é classificado como agente carcinogênico com limitada evidência para câncer de mama (INCA, 2022).

O histórico familiar de casos de câncer de mama auxilia a identificação de indivíduos que podem ser portadores de uma mutação genética hereditária que predispõe a doença, como BRCA1 ou BRCA2. O número de parentes de primeiro grau com câncer de mama e a idade em que foram diagnosticados influenciam o risco individual de desenvolver a doença, mesmo que não tenha uma mutação conhecida (PEAIRS et al., 2017; BREWER et al., 2017).

Apesar de alta mortalidade, (GOLÇALVES et al., 2017), quando detectado em estágio inicial o tratamento e prognóstico da doença são favorecidos. O diagnóstico do carcinoma mamário é feito a partir da tríade diagnóstica constituída pelo exame clínico, imagem completa da mama (mamografia, ultrassonografia) e fechado após exame histopatológico, biópsia cirúrgica ou core biópsia (HARBECK, 2016).

A core biópsia é uma técnica percutânea minimamente invasiva para o diagnóstico de lesões palpáveis e não palpáveis. A técnica guiada por ultrassom é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico de lesões mamárias quando não é possível a biópsia estereotáxica, guiada por mamografia (KLIMBERG et al., 2016; COLLINS, 2020).

Por ser uma patologia complexa com alto grau de heterogeneidade intertumoral e intratumoral, é necessária uma abordagem personalizada para cada caso de câncer de mama. A classificação de seus subtipos é feita pela histopatologia e complementada pela patologia molecular, responsável pela estratificação do câncer de mama de acordo com a expressão gênica tumoral (YEO e GUAN, 2017). A classificação dos subtipos de câncer de mama, bem como das lesões mamárias benignas e pré-malignas, está em contínua evolução à medida que a compreensão da carcinogênese mamária aumenta (WHO, 2019).

A classificação histológica dos subtipos de câncer de mama é baseada no padrão de crescimento patológico. Existem mais de 20 tipos histológicos diferentes de câncer de mama, a maioria dos casos são classificados como de nenhum tipo especial (NST), o mais comum é o carcinoma ductal infiltrante, nenhum tipo especial (IDC-NST), que representa 70% a 80% dos cânceres invasivos. O segundo tipo mais comum é o carcinoma lobular invasivo (ILC), que representa cerca de 10% de todos os cânceres invasivos (TSANG et al., 2020).

A maioria dos casos de câncer de mama são de nenhum tipo especial, portanto o uso de marcadores para determinar o imunofenótipo da doença torna-se fundamental para o tratamento e prognóstico da doença. Os marcadores mais utilizados são: ER (receptor de estrogênio), PR (receptor de progesterona) e HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano) (TSANG et al., 2020; WILEY et al., 2020).

Atualmente 4 padrões moleculares clássicos são os mais frequentes nos casos de carcinoma mamário. O padrão molecular do tipo Luminal A, 30 a 40% dos casos, caracterizado como ER positivo, PR positivos alta expressão ($\geq 20\%$), HER2 negativo e Ki67 reduzido. O segundo padrão molecular mais frequente, 20 a 30% dos casos, é o Luminal B HER2 negativo, caracterizado como ER positivo, PR positivos com menor expressão ($< 20\%$), HER2 negativo e Ki67 ($> 20\%$). Outro padrão molecular é de Superexpressão do HER2 corresponde a 12-20%, caracterizado por ER e PR geralmente negativos com HER2 positivo e superexpresso. O padrão molecular Basal Like ou Triplo Negativo (TN), corresponde a 15-20% dos casos de câncer de mama, caracterizado por ER, PR e HER2 negativo, como menor sobrevida (TABELA 1) (FRAGOMENI et al., 2018).

Tabela 1- Padrões moleculares clássicos do câncer de mama por Imunohistoquímica

Classificação (FRAGOMENI et al., 2018)

Padrão molecular	ER	PR	HER2	Ki67
<i>Luminal A</i>	+	+	-	
<i>Luminal B</i>	+	+	-	
<i>Superexpressão HER2</i>	+/-	+/-	+	
<i>TN</i>	-	-	-	

Fonte: A autora (2023)

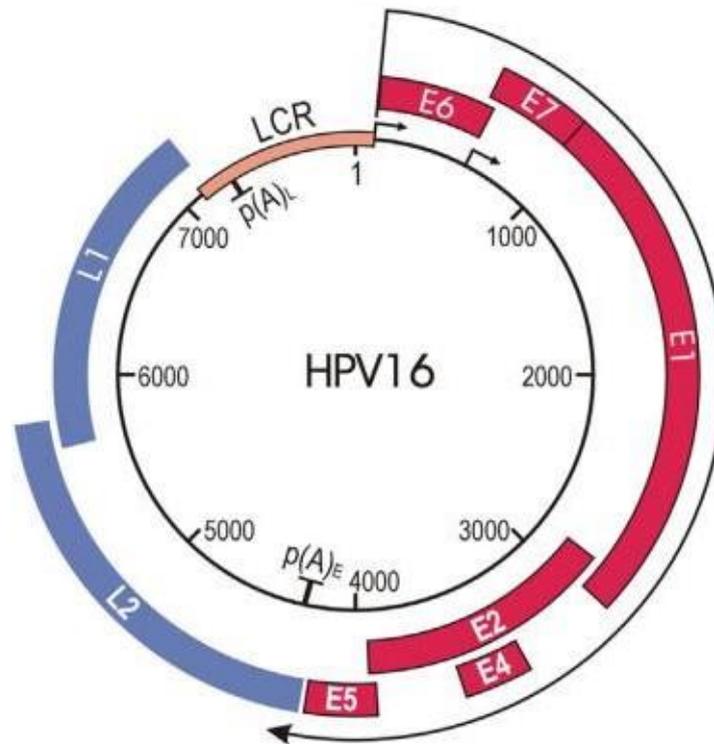
A etiopatologia do câncer de mama ainda não está bem esclarecida, apesar de bem elucidada os fatores de risco associados (SUN, 2017). Pesquisas de análises de associação viral com a carcinogênese mamária estão sendo conduzidas por vários grupos de pesquisas no mundo, levantando a hipótese que alguns vírus podem estar associados a etiopatogenia da doença (AMARANTE et al., 2009; OHBA et al, 2014). Dentre os vírus estudados está o Papilomavírus Humano (HPV), alguns estudos apontam evidências de que pode existir associação deste vírus com a carcinogênese mamária (JOSIH, 2012; KOULORA, 2018; LAWSON, 2018).

2.2 O HPV

O HPV é um vírus de DNA circular epiteliotrófico com cerca de 8.000 pares de base (pb), encerrado em um capsídeo icosaedro, pertencente a família Papillomaviridae (ZUR HAUSEN, 1996; BERNARD et al., 2010). Três regiões funcionais foram descritas do HPV: precoce ou Early (E) que codifica proteínas precoces E1- E7, região tardia ou late (L), que codifica duas proteínas tardias L1 e L2, e uma região regulatória LCR, do inglês long control region (Figura 2). (DOORBAR, 2005; BERNARD et al., 2010; DURZYNSKA et al., 2016).

Uma variante de HPV é caracterizada quando a sequência de DNA do gene L1 (ORF) do genoma viral clonado difere de qualquer outro tipo já caracterizado em pelo menos 10%. Esse gene codifica a principal proteína do capsídeo e é utilizado na classificação dos tipos de HPVs por ser razoavelmente conservado (BERNARD et al., 2010; BURK et al.,2013).

Figura 2 – Genoma do HPV. Organização do genoma de HPV16, Região precoce destacada em vermelho, região tardia destacada em lilás, região regulatória destacada em laranja.



Fonte: Adptado de DURZYNSKA et al. (2016).

A região E representa 45% do genoma viral, codifica pelo menos seis oncoproteínas virais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, todas com funções regulatórias no epitélio infectado. A região L é responsável pela síntese das proteínas estruturais do capsídeo L1 e L2. Já a região LCR regulam a replicação viral, é a única região que não contém ORF (do inglês, open Reading frames), que são regiões com potencial para codificar proteínas. (ZUR HAUSEN, 1996; MÜNGER et al., 2004; GANGULY e PARIHAR, 2009).

Cerca de 200 variantes de HPVs foram caracterizados, apesar da relação filogenética, a patogenicidade dessas variantes pode variar entre si. Os HPVS são subdivididos em HPV de alto risco (HR -HPV) ou HPV de baixo risco (LR- HPV), dependendo de sua patogenicidade e propensão para desenvolver alterações malignas no hospedeiro. O gênero alphapapillomavirus (alpha HPV) está relacionado com o desenvolvimento de lesões benignas e malignas, como câncer cervical, anal e de cabeça e pescoço (BURK et al.,2013; DURZYNSKA et al.,2016; LIMA et al., 2016).

A associação do HPV com a carcinogênese cervical é bem definida e, sendo os tipos de alto risco HPV-16 e HPV-18 epidemiologicamente destacados (ZUR

HAUSEN,2002; PITTAYAKHAJONWUT et al., 2010). A associação do HPV de alto risco com outros tipos de neoplasias como o câncer anogenital e o câncer de cabeça e pescoço também está estabelecida (SERRANO, 2018).

A infecção por HR- HPV por si só não leva ao desenvolvimento de lesões malignas, são necessárias uma infecção persistente e a falta de uma resposta imune inata e adaptativa apropriada do hospedeiro. A capacidade de latência do HPV pode aumentar a probabilidade de infecção persistente (FERA et al., 2021).

Para a infecção seja estabelecida, o HR-HPV deve ter acesso à lâmina basal do epitélio estratificado através da junção escamo colunar do tecido epitelial ou de microlesões. Proteínas do capsídeo L1 ligam-se a Proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs) da membrana basal e/ou superfície dos queratinócitos basais que induz a exposição do capsídeo L2 durante esse processo parte do capsídeo L1 é desintegrado. No interior da célula o vírus migra pelo citoplasma pela via endossomo/lisossomo, a proteína L2 conduz o genoma viral até o núcleo (SCARTH et al., 2021).

A célula basal infectada torna-se reservatório do DNA viral mantido em forma episomal em baixo número. Posteriormente o vírus se integra ao genoma do hospedeiro perdendo parte de seu gene E2 levando à expressão desregulada das proteínas E6 e E7. As proteínas E6 e E7 inibem as proteínas supressoras de tumor do hospedeiro como a p53 e pRB, dessa forma essas oncoproteínas estimulam a proliferação das células hospedeiras (BHATTACHARJEE et al., 2022).

A oncoproteínas E6 aumenta a instabilidade cromossômica e resistência, resistência à apoptose atuando como antagonista do gene p53 e BCL2(B-cell Leukemia/Lymphoma 2). A oncoproteína E7 atua no pRB liberando o fator de transcrição E2F promovendo a proliferação celular. E6 e E7 antagonizam as funções dos genes BCRA1 e BCRA2, que são responsáveis por reparar danos ao DNA (KHODABANDEHLOU, 2019).

2.3 HPV E O CÂNCER DE MAMA

A possível correlação do HPV na carcinogênese mamária não está definida, contudo células do tecido mamário contendo DNA de HPV foram identificadas ao redor do carcinoma (MALHONE et al, 2018). Em 1990 Band et al. conduziu um estudo sugerindo que a infecção pelo HPV pode estar associada a carcinogênese mamária.

Descobriu-se que o HPV imortaliza células epiteliais mamárias humanas normais diminuindo a necessidade de fatores de crescimento nessas células (BAND et al., 1990). Em 1992, Di Lonardo e colaboradores observaram presença de DNA de HPV-16 em 29,4% dos tecidos mamários malignos (LONARDO et al., 1992).

Vários estudos tem relatado a infecção pelo HPV no câncer de mama, em contrapartida outros estudos não conseguiram identificar DNA de HPV no tumor mamário. A frequência do HPV encontrada também variou amplamente entre os estudos (ISLAM et al., 2020). Layson e colaboradores identificaram o mesmo HR-HPV nas amostras cervicais e mamárias de 46% das pacientes, indicando que pode existir uma associação à neoplasia cervical e posterior câncer de mama em idade jovem. Apesar dessas associações serem incomuns e representar uma proporção pequena dos cânceres de mama (LAYSON et al., 2016).

A possibilidade de infecção por HPV no tecido mamário por via circulatória ainda não foi comprovada e permanece como especulação. Outra teoria de infecção por HPV no tecido mamário é através de microlesões mamilares ou aréolas do tecido epitelial mamário durante a relação sexual oral-mama ou genital-mama (BLANCO et al., 2021).

Apesar de cerca de 30 anos desde que a hipótese da possível correlação da infecção por HPV com a carcinogênese mamária, a presença do HPV no câncer de mama apresenta inconsistências e não está esclarecido como acontece a infecção no tecido mamário. Apesar dessas implicações a presença do HPV em tecido mamário não pode ser negada (KUDELA et al., 2022).

3 OBEJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade de detecção de HPV por meio da técnica de PCR em amostras benignas e malignas de core biópsia mamária de pacientes do sexo feminino do período de 2018 a 2022 oriundas do Hospital das clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 OBEJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar pela técnica da PCR convencional a presença do DNA de HPV utilizando os iniciadores (primers) GP5/GP6 em amostras de blocos parafinados de core biópsia mamária.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

O estudo foi classificado como transversal retrospectivo observacional.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi apresentado sob o CAAE nº: 28508614.9.0000.5208 (Anexo A) ao Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

As pacientes e familiares que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). As informações foram utilizadas a identidade das participantes foi mantida em sigilo absoluto, o projeto não interferiu nos procedimentos de rotina do serviço.

4.3 LOCAL DE ESTUDO E ORIGEM DAS AMOSTRAS

O estudo foi realizado com base na análise dos prontuários médicos obtidos no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE). As amostras foram obtidas no arquivo de blocos parafinizados do Laboratório de Anatomia Patológica do (HC-UFPE).

4.3.1 Coleta, fixação e processamento histopatológico das amostras

As voluntárias para a pesquisa foram atendidas por um médico especialista em radiologia e diagnóstico por imagem, no Departamento de Diagnóstico por Imagem do Hospital das clínicas da UFPE. Os pacientes eram orientados a respeito do exame e após assinar o TCLE o estudo era iniciado.

Os fragmentos de core biópsia mamária foram coletados guiados por USG com uma pistola semiautomática de 16G de calibre. Foram coletados em torno de cinco fragmentos de cada lesão e fixados em formaldeído à 10%.

Os fragmentos de core biópsia mamária fixados em formaldeído à 10% foram encaminhados para o setor de Anatomia Patológica do Hospital das clínicas da UFPE. Seguindo o protocolo pré-estabelecido na rotina do setor, as amostras foram devidamente desidratadas em álcool etílico, diafinizadas em xilol e parafinizadas. Lâminas dos blocos parafinados foram preparadas e coradas por Eosina e Hematoxilina (HE), em seguida foram analisadas e laudadas pelos médicos patologistas do setor. Após a liberação dos laudos os blocos e lâminas foram arquivados.

4.3.2 Resgate dos laudos histopatológicos e dos blocos de parafinados de core biópsia mamária

Nos arquivos do setor de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE, os laudos histológicos das core biópsias mamárias foram resgatados. Em seguida foram resgatados todos os blocos parafinados de core biópsia que possuíam o laudo histológico maligno e alguns de fibroadenoma do período de 2018 a 2022. Também foram separadas as lâminas histológicas coradas em HE desses blocos, confeccionadas para diagnóstico, para avaliação da qualidade dos blocos e quantidade de tecido disponível para extração de DNA do material.

4.4 MATERIAL DE ESTUDO

Foram utilizadas no presente estudo amostras parafinadas de core biópsia de tecido mamário de pacientes do sexo feminino. Foram selecionadas o total de 60 amostras, 12 com laudo histopatológico benigno de fibroadenoma e 48 com laudo histopatológico maligno de carcinoma.

As amostras com alteração histológica benigna do tipo Fibroadenoma foram utilizadas como grupo controle. As 48 amostras com alteração histológica maligna foram utilizadas como grupo teste, dentre elas 40 laudadas como Carcinoma Ductal Invasivo, 3 de Carcinoma Ductal In Situ e 5 de Outros Tipos de Carcinoma (Tabela 1).

Tabela 2- Amostras parafinadas de core biópsia mamária selecionadas

	LAUDO HISTOPATOLÓGICO	Nº DE AMOSTRAS
<i>GRUPO CONTROLE</i>	Fibroadenoma	12
<i>GRUPO TESTE</i>	Carcinoma Ductal Invasivo	40
	Carcinoma Ductal In Situ	3
	Outros Tipos de Carcinoma	5

Fonte: A autora (2023).

A classificação histológica do tecido mamário utilizada no presente estudo está de acordo com a classificação da OMS.

4.4.2 Critérios de inclusão

- Blocos parafinados de core biópsia mamária de pacientes que assinaram o TCLE;
- Blocos parafinados de core biópsia mamária do período de 2018 a 2022 com o laudo histopatológico de fibroadenoma ou carcinoma.

4.4.3 Critérios de exclusão

- Blocos parafinados de core biópsia mamária de pacientes que não assinaram o TCLE;
- Blocos parafinados de biópsia cirúrgica mamária;
- Blocos parafinados de core biópsia mamária de pacientes do sexo masculino;
- Blocos parafinados de core biópsia mamária de pacientes abaixo de 18 anos;
- Blocos parafinados de core biópsia mamária que se apresentam danificados e/ou escassos;
- Blocos parafinados de core biópsia mamária que não continham adequada identificação ou sem Relatório Anatomopatológico completo.

4.5 ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram obtidos 10 cortes de 4 μm de espessura, de cada um dos 60 blocos parafinados de core biópsia mamária, cortados em micrótomos manual (Figura 3). Esses cortes foram armazenados em tubos estéril de 1,5 ml para posterior extração de DNA visando a detecção do HPV. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento do processamento para a extração do DNA.

Figura 3 – Micrótomos e blocos parafinados de core biópsia mamária. Micrótomos utilizados para corte dos blocos parafinados e alguns blocos selecionados.



Fonte: A autora (2023).

4.5.1 Extração de DNA para detecção de HPV

As amostras de core biópsia mamária foram submetidas a Extração de DNA conforme o kit de extração QIAMP DNA FFPE Tissue, da marca Qiagen, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Em seguida todas as amostras foram quantificadas através de um espectrofotômetro modelo NanoDrop™ Lite, da Thermo Scientific, e em seguida armazenadas em freezer a -20°C .

4.5.2 Detecção do DNA de HPV por PCR convencional

A detecção de DNA de HPV foi realizada utilizando os iniciadores (primers) GP5+/GP6+ (Tabela 3).

Tabela 3- Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos

PRIMER	SEQUÊNCIA (5'→3')	TAMANHO (pb)	REFERÊNCIA
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	170pb	Roda Husman et al., 1995
GP6+	GAAAATAAACTGTAAATCA		

Fonte: A autora (2023).

Posteriormente, foi feito uma reamplificação utilizando os mesmos primers, visando aumentar a quantidade de cópias do DNA viral.

As condições de termociclagem para os primers GP5/6 foram: destanuração inicial a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de: 30 s a 95°C, 1 min a 54°C e 30s a 72°C e extensão final 72°C por 10 min.

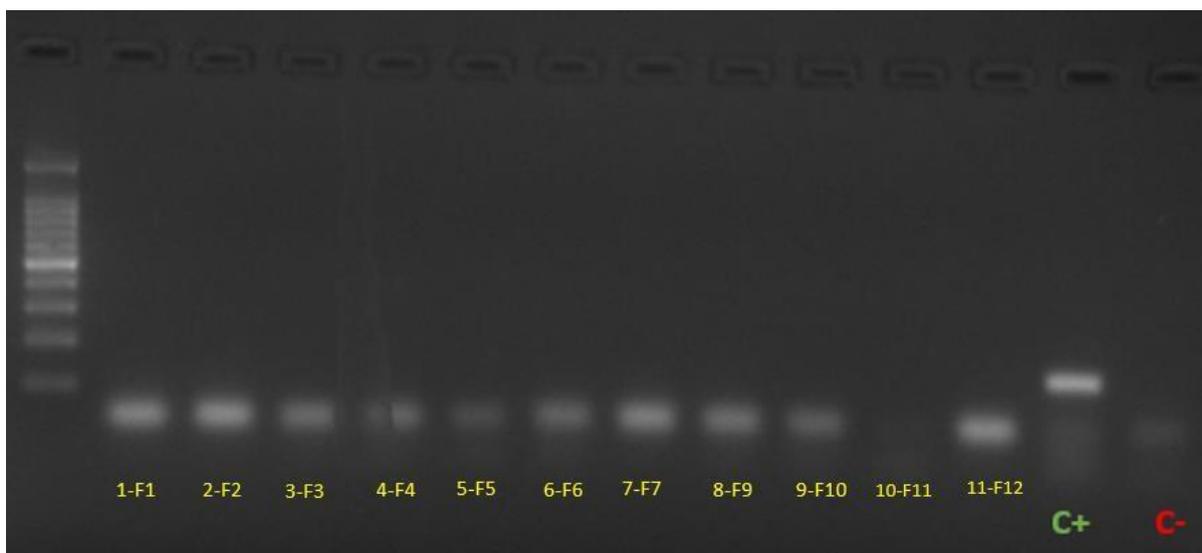
Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio a 10%. Todas as amostras foram amplificadas na presença de controle positivo (HELA CELL HPV 18) e negativo (água mili-Q).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 60 amostras parafinadas de core biópsia mamária, 32 amostras (53,33,%) foram excluídas após o processo de extração de DNA e não seguiram para a etapa de detecção do HPV por PCR convencional. Essas amostras tiveram um valor quantificado pelo espectrofotômetro abaixo de 19 nanogramas, considerado inviável para ser amplificado pela técnica de PCR convencional.

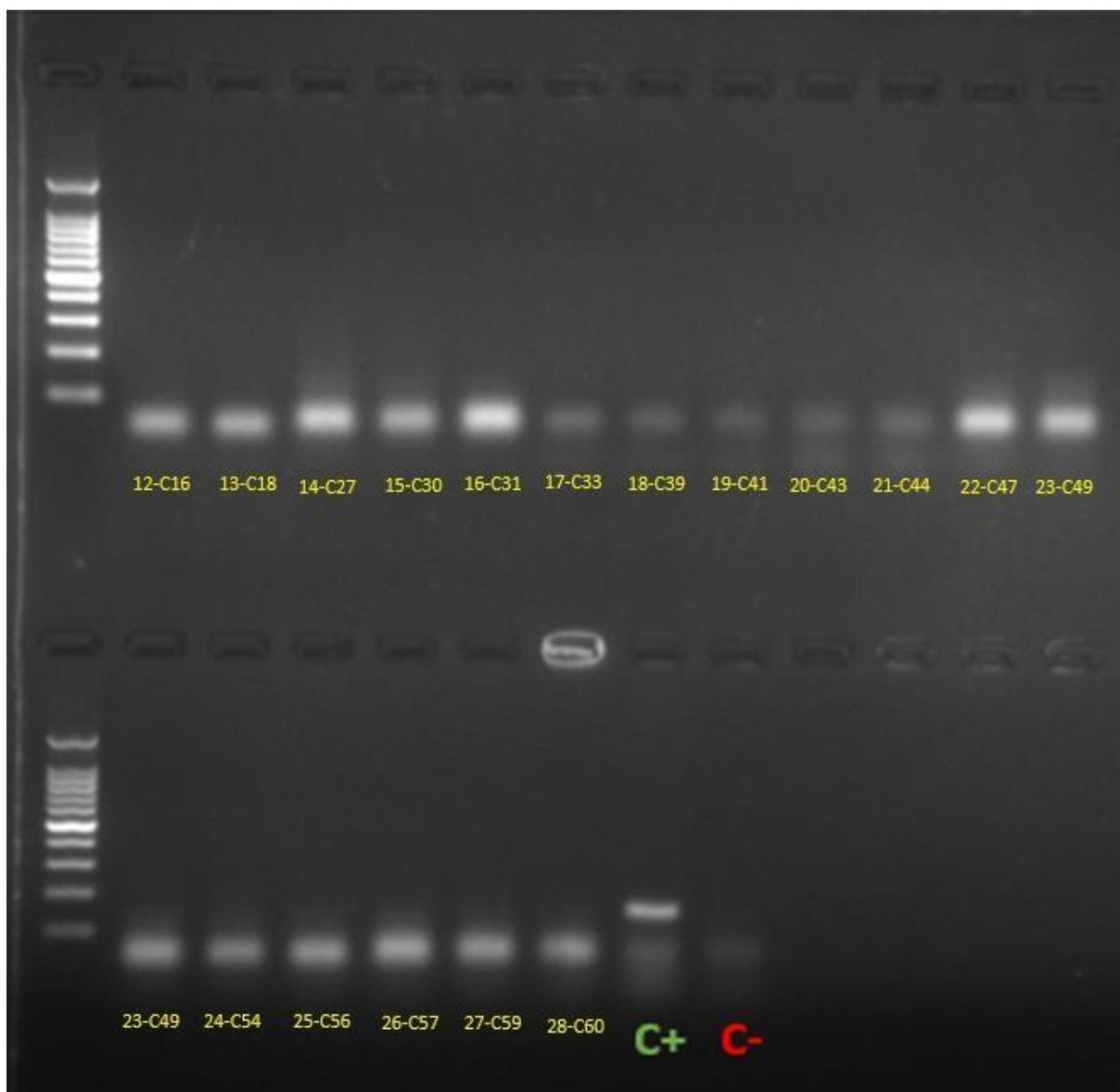
As 28 amostras (46,6%) que tiveram quantificação acima de 19 nanogramas foram submetidas a PCR convencional e posterior reamplificação conforme descrito na metodologia. Todas as amostras tiveram resultado negativo para DNA de HPV utilizando os primers GP5/GP6 conforme mostra a Figura 4 e 5.

Figura 4 – Gel de PCR de HPV primers GP5+/ GP6+ Grupo Controle Fibroadenoma. Extraído de amostras parafinadas de core biópsia mamária utilizando o o kit de extração QIAMP DNA FFPE Tissue, da marca Qiagen, com quantificação maior que 19 nanogramas. C+, destacado de verde é o controle positivo (DNA de HPV18+ de cultura HELA CEL) e C-, destacado de vermelho é o controle negativo da PCR (água mili-Q).



Fonte: A autora (2023).

Figura 5 – Gel de PCR de HPV primers GP5+/GP6+ Grupo Teste Carcinoma. Extraído de amostras parafinadas de core biópsia mamária utilizando o kit de extração QIAMP DNA FFPE Tissue, da marca Qiagen, com quantificação maior que 19 nanogramas. C+, destacado de verde é o controle positivo (DNA de HPV18+ de cultura HELA CEL) e C-, destacado de vermelho é o controle negativo da PCR (água mili-Q).



Fonte: A autora (2023).

Alguns estudos na literatura utilizando diferentes metodologias foram capazes de detectar DNA de HPV em lesões malignas mamárias. Afshar e colaboradores (2018) utilizando a técnica de RT-PCR e primers consenso MY09/MY11 detectaram HPV em 8,2% das amostras em amostras fixadas em formalina e embebidas em parafinas. Outro estudo utilizando a técnica de PCR para os primers consenso MY09/MY11, GP5+/GP6 e mPCR para o primers E6 e E7, de amostras parafinadas

detectaram DNA de HPV em 49.5% das amostras (AFSHAR,2018; CAVALCANTE, 2018).

Utilizando amostras frescas de carcinoma mamários conservadas em nitrogênio líquido (- 80°C) e primers consenso da região L1 e E7, um estudo no Irã, identificou o HPV em 48.6% das amostras (KHODABANDEHLOU et al., 2019). Outro estudo no Irã detectou DNA em amostras parafinadas de carcinoma mamário, foi identificado os genótipos HPV18 e HPV6 em 11,8% das amostras. O primers utilizados foi MY09/MY11, GP5+/GP6+, HPV 18 E6 and HPV 16 E7 e técnica de PCR.(MOFRAD et al., 2021).

Um estudo Ruanda também identificou presença de HPV em 46,81% das amostras, utilizando os primers consenso GP5+/GP6+, MY09/MY11e a técnica de PCR e posterior tipificação por sequenciamento. O estudo concluiu que a maior HR-HPV apareceu com frequência em casos de câncer de mama, sendo o HPV-16 o mais frequente (HABYARIMANA, 2018). HR-HPV também foi detectado de amostras congeladas de câncer de mama provenientes de biópsia cirúrgica. Foi detectado o HPV em 22,2% das amostras. HPV-16 em 87,5% das amostras, hpv-18 em 12,5% e 0% do HPV-31(EL-SHEIKh, 2021).

No presente estudo não foi possível detectar DNA de HPV em tecido mamário utilizando amostras parafinadas de core biópsia através da técnica de PCR convencional utilizando os primers consenso GP5/GP6. Alguns fatores que podem ter corroborado para este resultado no presente estudo devem ser considerados, como por exemplo: o processamento histopatológico das amostras, o processo de extração de DNA, os primers escolhidos para detecção do HPV, entre outros.

As amostras utilizadas foram provenientes de core biópsia de mama fixada em formalina e embebidas em parafinas. A formalina utilizada como fixador é responsável por modificar o DNA das amostras (HONGDO DO e DOBROVIC, 2015) Apesar da estrutura morfológica ser preservada no processo de fixação e parafinização, parte do DNA é degradado, o que ocorre mais uma vez no processo de desparafinização para extração do DNA (SCORSATO, 2011). Também deve ser considerado que as amostras biológicas de core biópsia pode não possuir a representatividade do tumor, ou possuir carga significativa de células infectadas pelo HPV. Dessa forma o material biológico teve a quantidade e qualidade de DNA comprometidos através de seu processamento e por questões intrínsecas de como a própria amostra foi coletada.

Além disso deve ser levado em consideração que a infecção por HPV normalmente ocorre com carga viral baixa (BLANCO,2021). Outro fator importante é que os primers utilizados para a detecção de HPV foram os primers GP5/GP6 que amplificam a região L1 do genoma do HPV (EVANS, 2005). O a proteína do capsídeo L1 é desintegrada na fase epissomal do ciclo do HPV (BHATTACHARJEE et al., 2022). Primers como E6 e E7 podem ser mais sensíveis para a detecção do HPV porque não estaria limitado a amplificar o DNA de HPV apenas fase epissomal, mas também na fase após o genoma do HPV estar integrado ao genoma do hospedeiro.

Mais estudos, com um tamanho amostral maior e métodos que levem em consideração a complexidade envolvida e a prevalência relativamente baixa da infecção pelo HPV no carcinoma mamário, são necessários para elucidar a possível associação do HPV com a carcinogênese mamária (KUDELA et al., 2022).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, não foi possível detectar DNA de HPV em amostras parafinadas de core biópsia de mamária de lesões benignas e malignas, por meio da técnica de PCR convencional utilizando o primers GP5+/GP6+. Mais estudos utilizando outros primers consenso que possam ser mais sensíveis para detectar a presença do HPV no câncer de mama, como por exemplo os primers de E6 e E7, um maior número de amostras, serão de grande valia para a comunidade científica, bem como o aprimoramento das técnicas utilizadas para otimizar os resultados.

REFERÊNCIAS

AMARANTE M. K e t al. The possible involvement of virus in breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, 135(3), 329–37, 2009.

ARSHI et al., Expression analysis of MALAT1, GAS5, SRA, and NEAT1 lncRNAs in breast cancer tissues from young women and women over 45 years of age. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, 12, 751–757, 2018.

BAND et al. Human Papilloma Virus DNAs immortalize Normal Human Mammary Epithelial Cells and Reduce Their Growth Factor Requirements. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87, 463–467. USA, 1990.

BERNARD H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, 401, 70–79, 2010.

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

BLANCO et al., Human Papillomavirus in Breast Carcinogenesis: A Passenger, a Cofactor, or a Causal Agent? **Biology**, 10, 804, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology10080804>. Acesso em: 02/02/2023.

BREWER et al. Family history and risk of breast cancer: An analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Res. Treat.** 165, 193–200, 2017.

BURK et al. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, virol.07.018i, 2013.

CAVALCANTE et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, 73(13), e465, 2018.

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

DURZYNSKA, et al., Human papillomaviruses in epigenetic regulations, **Mutation Research** 772, 36–50 37, 2017.

El-Sheikh et al. Assessment of Human Papillomavirus Infection and Risk Factors in Egyptian Women with Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, 15, 1–10, 2021.

EVANS et al. Touchdown General Primer (GP5+/GP6+) PCR and optimized sample DNA concentration support the sensitive detection of human papillomavirus. **licensee BioMed Central Ltd**, 2005.

FERA et al. Persistent Human Papillomavirus Infection. **Viruses**, 13, 321, 2021.

FRAGOMENI ET AL., Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am.** 27(1): 95–120. January, 2018

GANGULY N et al. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **Journal of Biosciences**, 34(1), 113–23, 2009.

GONÇALVES, C. V, et al. Women' s Knowledge of methods for scondary prevention of breast cancer. **Ciência e Saúde Coletiva**, Dec; 22(12): 4073- 4082, 2017.

HABYARIMANA et al. Detection of human papillomavirus DNA in tumors from Rwandese breast cancer patients. **Breast Cancer**, 25(2), 127–133, 2018.

HARBECK et al., Breast câncer. **The Lancet**; 389: 1134–50, 2016.

HONGDO DO e DOBROVIC. sequence artifacts in dna from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. **Clinical chemistry** 61:1, 2015.

IARC - INTERNACIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Global cancer observator, Cancer Today**, 2023.

Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D

Acessado em: 17/03/2023.

INCA, INSTITUO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Câncer de mama**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama> Acessado em: 17/03/2023

INCA, INSTITUO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). **Números de Câncer**, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf> Acessado em: 17/03/2023.

ISLAM et al., Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. **Ann Transl Med** 8(10):650, 2020.

JOSHI D., BUEHRING G.C. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. **Breast Cancer Res Treat**, 135: 1- 15, 2012.

KASHYAP et al., Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. **Hindawi BioMed Research International**. Article ID 9605439, 16, 2022.

KHODABANDEHLOU et al. Human papilloma virus and breast cancer: the role of inflammation and viral expressed proteins. **BMC Cancer**. 19:61, 2019.

KLIMBERG et al., Ultrasound image-guided core biopsy of the breast. **Chinese Clinical Oncology**. 5(3):33, 2016.

KOULORA et al., HPV infection and breast cancer. Results of a microarray approach. **The Breast**. 40, p 165e169, 2018.

KUDELA et al., HPV-Associated Breast Cancer: Myth or Fact? **Pathogens**, 11, 1510. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121510>, 2022.

LAWSON et al., Human Papilloma Virus Identification in Breast Cancer Patients with Previous Cervical Neoplasia. **Front. Oncol.**, 5, 298, 2016.

LAWSON et al., 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**, vol. 8 article 1, 2018.

LIMA et al., Putative Mechanisms of Viral Transmission and Molecular Dysregulation of Mammary Epithelial Cells by Human Papillomavirus: Implications for Breast Cancer. **Current Molecular Medicine**, 16(7), 650–659., 2016.

LONARDO et al., Human papillomavirus in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, 21, 95–100, 1992.

MALHONE et al. Is Human Papilloma Virus Associated with Breast Cancer? A Review of the Molecular Evidence. *Acta Cytol.* 62, 166–177, 2018.

MINAMI et al. Reproductive history and breast cancer survival: a prospective patient cohort study in Japan. **Breast Cancer** <https://doi.org/10.1007/s12282-019-00972-5> , 2019.

MOFRAD et al. Detection of human papillomavirus genotypes, herpes simplex, varicella zoster and cytomegalovirus in breast cancer patients. **Virology Journal**, 18(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01498-z>, 2021.

MÜNGER K. et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. OHBA K. et al. In Vivo and In Vitro Studies Suggest a Possible Involvement of HPV Infection in the Early Stage of Breast Carcinogenesis via APOBEC3B Induction. **Plos ONE**, 9, e97787, 2014.

PEAIRS et al., Screening for breast cancer. **Seminars in Oncology**, 2017.

PITTAYKHAJONWUT D., ANGELETTI PC. Viral trans-factor independent replication of Human Papillomavirus genomes. **Virology J**, 7: 123, 2010.

SCARTH et al. The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. **Journal of General Virology** 102:001540, 2021.

SCORSATO et al, Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. **Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 5, p. 541-548 outubro, 2011.

SERRANO et al., Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, 47 p 14e26, 2018.

SHAOYUAN LEI, et al., Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from 2000 to 2020. **Cancer Communications**. Volume 41, Issue 11, p 1079- 1247, 2021.

SUN et al., Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**. 13(11): 1387-1397, 2017.

TSANG et al., Molecular Classification of Breast Cancer. **Adv Anat Pathol**. Volume 27, Number 1, January, 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of tumours. **Breast tumours. Editora WHO classification of tumours editorial board**, 5° ed vol. 2, 2018.

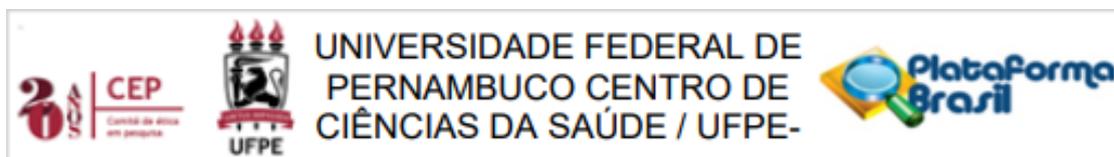
WILEY et al. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. **Histopathology**, 77, 181–185, 2020.

YEO E GUAN. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? **Cell Preeviews**, 2017.

ZUR HAUSEN H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, 1288, F55–78, 1996.

ZUR HAUSEN H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, 2 (5): 342-50, 2002

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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: 5

CAAE: 28508614.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.520.358

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Emenda para a inclusão da instituição Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer (Hospital do Câncer de Pernambuco) como coparticipante na pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Avaliar a existência de relação entre a infecção pelo HPV com a patogênese do câncer de mama e a aplicação das oncoproteínas como marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos.

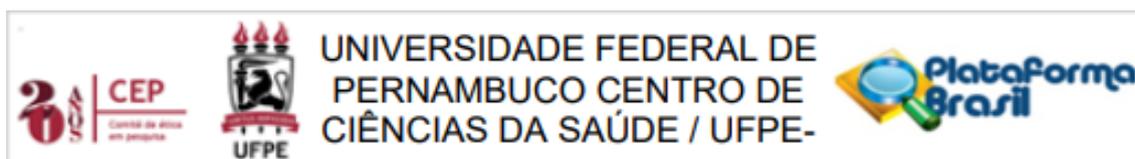
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar e genotipar o DNA de HPV em material mamário de pacientes com câncer de mama;
- Avaliar a carga viral do HPV em material mamário de pacientes com câncer de mama;
- Avaliar a expressão dos genes E2, E6 e E7 do HPV e consequente produção das oncoproteínas E6 e E7 no material mamário de pacientes com câncer de mama;
- Verificar a associação entre Papilomavírus humano e câncer de mama.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Há um possível risco de extravio dos blocos de parafina, no entanto, poderão ser minimizados em virtude do transporte ser realizado pelos próprios pesquisadores diretamente do

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



Continuação do Parecer: 2.520.358

laboratório (arquivo) para o laboratório de pesquisa.

Benefícios: Estudos sobre o envolvimento do HPV em câncer de mama têm grande importância para a área médica, porém até o momento, não existem dados relevantes no Brasil. Assim, o presente estudo deverá contribuir para:

- Identificação se há associação do câncer de mama com HPV;
- Desenvolvimento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas para o câncer de mama;
- Identificação dos tipos virais presentes nos tumores de mama;

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de cunho científico, podendo trazer benefícios para as pacientes com câncer de mama, em relação a prevenção e tratamentos futuros, desde que comprovada a participação do HPV nesta enfermidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos encontram-se adequados.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

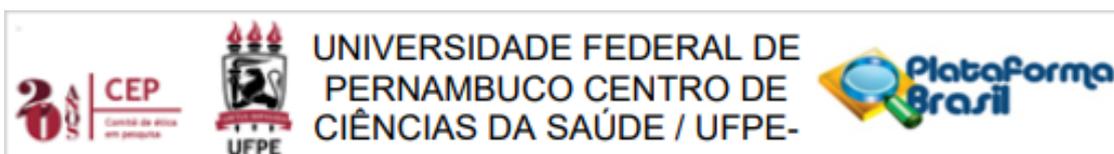
Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_108048_1_E3.pdf	28/02/2018 11:10:27		Aceito
Outros	justificativaadendoHCP.pdf	28/02/2018 11:09:41	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	carta_sobre_adendo_2017.pdf	20/12/2017 13:12:55	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_HCP.pdf	26/11/2017 23:28:10	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	SAME_HCP.pdf	26/11/2017 23:27:42	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito

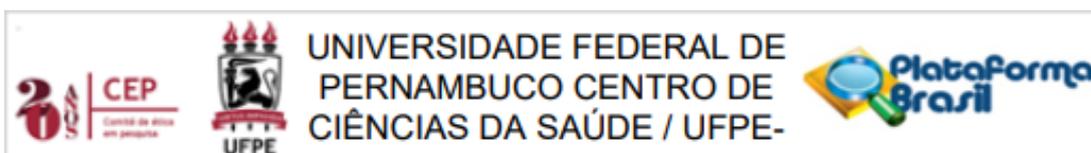
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.520.358

Outros	Autorizacao_Setor_Patologia_HCP.pdf	26/11/2017 23:27:22	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Autorizacao_Setor_Mama_HCP.pdf	26/11/2017 23:26:43	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HUOC_Radiologia.pdf	26/11/2017 23:26:15	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HUOC_Patologia.pdf	26/11/2017 23:25:54	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HCP.pdf	26/11/2017 23:25:08	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HC_Radiologia.pdf	26/11/2017 23:24:40	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_HC_Patologia.pdf	26/11/2017 23:24:17	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	CV_Clessia.pdf	26/11/2017 23:22:37	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	CV_Ana_Paula.pdf	26/11/2017 23:21:12	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	CV_Ana_Karina.pdf	26/11/2017 23:20:37	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mama_geral_CEP_2017.doc	26/11/2017 23:16:34	Jacinto da Costa Silva Neto	Aceito
Outros	Carta_sobre_adendo-2014-09-19.pdf	19/09/2014 17:00:32		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - HBL-2014-09-11.docx	19/09/2014 16:58:30		Aceito
Outros	HBL-Anuencia_mama--001.pdf	19/09/2014 16:55:18		Aceito
Outros	Termo_de_compromisso- resultados_blocos-2014-05-14.pdf	12/05/2014 11:57:21		Aceito
Folha de Rosto	CEP_Mama-HC--2013-03-13.pdf	13/03/2014 11:36:05		Aceito
Outros	CV-Olivia-2013-03-13.pdf	13/03/2014 11:15:08		Aceito
Outros	CV-Jonathan-2013-03-13.pdf	13/03/2014 11:14:14		Aceito
Outros	CV-Camila-2013-03-13.pdf	13/03/2014 11:13:49		Aceito
Outros	CV-Bianca-2013-03-13.pdf	13/03/2014 11:13:34		Aceito
Outros	TERMO DE CONFIDENCIALIDADE- 2014-03-13.pdf	13/03/2014 10:46:08		Aceito
Outros	CV-Elias-2013-03-13.pdf	13/03/2014 10:34:18		Aceito

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



Continuação do Parecer: 2.520.358

Outros	CV-Dafne-2013-03-13.pdf	13/03/2014 10:34:01		Aceito
Outros	CV-Giwellington-2013-03-13.pdf	13/03/2014 10:33:43		Aceito
Outros	CV-Elyda-2013-03-13.pdf	13/03/2014 10:33:27		Aceito
Outros	CV-Jacinto-2013-03-13.pdf	13/03/2014 10:32:46		Aceito
Outros	Anuência_HC-Mama_2014-03-11--001.pdf	13/03/2014 10:14:14		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 01 de Março de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Estudo da patogênese mamária, sua associação com o HPV e identificação de novos potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico das lesões**”, que está sob a responsabilidade do pesquisador Jacinto da Costa Silva Neto (residente na Rua General Americano Freire, 562 Boa Viagem, Apart 1402, cep: 51021-120, telefone: 081 3326-9516, e-mail: jacintocosta@hotmail.com). Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Ana Karina Brizeno (Telefone: 081 991663853) e Ana Paula Fernandes (Telefone: 081 991436590).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo dessa pesquisa é estudar fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama, para isso vamos utilizar os resultados dos seus exames bem como parte das amostras coletadas para realizar os estudos laboratoriais. Sua participação nesta pesquisa consistirá em autorizar o uso das amostras coletadas durante seus exames de rotina e responder a um questionário sobre seu histórico de saúde e estilo de vida. Como as amostras utilizadas no projeto serão resgatadas após a realização dos seus exames, não há nenhum tipo de risco. Caso se sinta constrangida com alguma pergunta do questionário pode ficar a vontade para não responder, ressaltamos que este será aplicado de forma discreta e individual e as respostas são sigilosas. A sua colaboração é voluntária, ou seja, não é obrigatória. Os benefícios em cooperar com a pesquisa consistem em: exames complementares para o diagnóstico do vírus HPV e orientação do curso da doença caso confirmada (prognóstico do câncer), além de contribuir para o entendimento dos mecanismos do desenvolvimento do câncer e de novas formas de tratamento da doença.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (informações dos questionários e resultados dos seus exames) ficarão armazenados em pastas de arquivo e no computador pessoal, sob a responsabilidade dos pesquisadores acima citados, pelo período mínimo de 4 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 - e-mail: cepccs@ufpe.br.

Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____

_____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo: “Estudo da patogênese mamária, sua associação com o HPV e identificação de novos potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico das lesões” como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____/_____/_____.

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar (2 testemunhas não ligadas a equipe).

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____