



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DAFFANY LUANA DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PAPEL DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO CONTEXTO DO
MICROAMBIENTE TUMORAL DO CÂNCER DE MAMA**

Recife

2023

DAFFANY LUANA DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PAPEL DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO CONTEXTO DO
MICROAMBIENTE TUMORAL DO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor(a) em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador (a): Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador (a): Dr^a Anna Jéssica Duarte Silva

Dr^a Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
crb4/1381

Santos, Daffany Luana dos

Análise do papel Papilomavírus humano no contexto do microambiente tumoral do câncer de mama. / Daffany Luana dos Santos. – 2023.

88 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas.

Coorientadoras: Anna Jéssica Duarte Silva; Cristiane Moutinho Lagos Melo.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências e anexos

1. Câncer de mama. 2. HPV. 3. Microambiente Tumoral. 4. Resposta imunológica. I. Freitas, Antonio Carlos de (Orient.). II. Silva, Anna Jéssica Duarte (Coorient.). III. Melo, Cristiane Moutinho Lagos (Coorient.). IV. Título.

5616

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-110

DAFFANY LUANA DOS SANTOS

**ANÁLISE DO PAPEL DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NO CONTEXTO DO
MICROAMBIENTE TUMORAL DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico em Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 01/11/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Breno Caldas de Araujo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Paulo Euzebio Cabral Filho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Eleonidas Moura Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pois sem Ele não teria conseguido de forma alguma. A Ele toda honra e toda glória. Foi Ele quem me trouxe até aqui, e por muitos momentos, sentia que Ele me carregava em Seus braços ou segurava na minha mão. Ele também me enviou pessoas especiais e que me ajudaram em tantos aspectos. E aqui menciono algumas delas.

Gostaria de iniciar pelos meus pais, Josefa e João, que desde sempre acreditaram que eu poderia ser o que eu quisesse. Desde cedo me apoiando em todos meus sonhos e projetos: “Essa menina é muito desenrolada!”, eles diziam constantemente. E ao menos nesses momentos eu de fato sentia que poderia ser o que quisesse. Porque eles me faziam crer nisso, desde muito pequena. Então, sou imensamente grata a “mainha” e o “painho” que Deus me deu. Também não posso esquecer o meu irmão Diego, que sempre me motivou, e sei da sua preocupação e cuidado comigo, que junto a minha cunhada Renata, me deram suporte moral e emocional.

Ao meu marido, Tony Belo, que está comigo desde a minha aprovação no mestrado, e agora continuamos juntos e firmes ao findar dessa jornada, chamada doutorado. Ele sempre me ajudou, me compreendeu, me motivou e impeliu quando já não encontrava forças. Tantas crises de ansiedade, noites sem dormir e ele sempre ao meu lado, respeitando esse processo e ajudando como podia. Não apenas meu esposo, mas também meus enteados e filhos do coração Gabriel e Davi, que também estiveram ao meu lado em toda essa caminhada, que muitas vezes, apesar de tão pequenos, me acolhiam em momentos de debilidade ou cansaço. Também sempre me impulsionando e acreditando em mim.

Agradeço muito ao professor e meu orientador, Antonio Carlos, que sempre muito cheio de empatia, esteve participando de cada fase até aqui e principalmente em momentos mais difíceis, sempre muito humano. Ele sempre se preocupou com nossa saúde mental, e o professor Antonio soube sempre nos entender nos piores momentos.

Não teria como esquecer a professora e também minha coorientadora, Cristiane Moutinho, que nos acolheu e praticamente colocou no colo, quando mais precisávamos. Outra professora que também, sempre com sua empatia, afeto, palavras de conforto e atenção, nos acompanhou boa parte dessa jornada e sem ela não seria possível chegar até aqui.

Agradeço a minha coorientadora/amiga Anninha, que teve sempre tanta paciência e cuidado comigo nesses anos. Sempre acompanhando tudo de perto, me encorajando quando mais precisei. Sempre com um sorriso lindo no rosto e uma doçura em momentos inimagináveis, até mesmo em suas correções, me arrancando boas risadas.

Agora queria agradecer a minha amiguinha/parceira Bibi. Quem nos conhece, sabe que nossos doutorados foram galgados juntos. Ela foi meu porto seguro e minha duplinha mais divertida. Me aguentou como ninguém e sem ela não chegaria aqui, certeza. Aproveito o ensejo para agradecer a todos meus amigos do LEMTE e do LAIA, em especial a Ruany e Vanessa, ao meu amigo Geo/Guel que foi imprescindível nesse trabalho, sempre presente e abdicando de tantas coisas para me ajudar. Agradeço imensamente também a Babi e Leo. Por fim, agradeço a minha amiga e comadre Nayara, sempre comigo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT). Ao secretário Paulo Germano, por estar sempre disponível e disposto a ajudar.

Muito obrigada!

RESUMO

O câncer de mama representa a neoplasia mais comum em todo o mundo. Sugere-se que as infecções virais estão envolvidas com a carcinogênese, especialmente aquelas causadas por genótipos oncogênicos do Papilomavírus Humano (HPV). Tomando o câncer cervical como modelo, após a infecção pelo HPV, ocorre um remodelamento do microambiente tumoral, proporcionando uma alteração pós-infecção com características imunossupressoras. Neste sentido, este estudo buscou avaliar a expressão dos genes JAK2, STAT3, STAT4, STAT6, FOXO4, em amostras de tumores com e sem a presença do HPV, além de analisar a influência do HPV na linhagem celular de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231), transfectada com os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV-16 e co-cultivada com PBMCs através dos seguintes marcadores: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD56, -CD25, -CD14, -B7.1, -B7.2, -HLA-DR. Anticorpos intracelulares anti-FoxP3, -perforina, granzima, -IL-17, -IFN, -IL-10 também foram utilizados. Para identificação específica da linhagem MDA-MB 231 foi utilizado o anticorpo anti-CD44. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- α e IL-17 foram investigadas. Foi realizada RT-qPCR do cDNA dos tumores de mama e imunofenotipagem das células transfectadas com E5, E6 e E7 e co-cultivadas. Em relação a avaliação do perfil sociodemográfico, a maioria das pacientes que eram HPV-positivas (64%), amamentavam (50%), tinham filhos (64%) e estavam na menopausa (42,86%). A análise de expressão gênica mostrou que na presença do HPV houve menor expressão dos genes STAT4, JAK2, STAT3 e STAT6 e maior expressão em amostras HPV-negativas, principalmente em STAT4. Sugerindo que o HPV pode estar atuando indiretamente na supressão da via JAK/STAT. Já a expressão de FOXO4 foi maior em amostras HPV-positivas, sugerindo que o HPV pode ter papel pró-tumoral no câncer de mama. Houve aumento no número de células TCD4+ quando estimuladas com MDA-MB-231 não transfectadas e transfectadas, especialmente com perfil Treg. Além disso, citocinas intracelulares pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-17 tiveram produção afetada pelas células transfectadas e uma diminuição na atividade citolítica dos linfócitos CD8+ e CD56+ também foi observada na presença de oncogenes do HPV, principalmente com E6 e E7 em células NK, e E5 em células TCD8+. Em conclusão,

os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV podem atuar regulando negativamente o número e a função de linfócitos e monócitos.

Palavras-chave: Câncer de mama; HPV; Microambiente Tumoral; Resposta imunológica.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common neoplasm worldwide. It is suggested that viral infections play a role in carcinogenesis, especially those caused by oncogenic genotypes of the Human Papillomavirus (HPV). Taking cervical cancer as a model, following HPV infection, a remodeling of the tumor microenvironment occurs, resulting in post-infection changes with immunosuppressive characteristics. In this study, we aimed to assess the expression of the JAK2, STAT3, STAT4, STAT6, and FOXO4 genes in tumor samples with and without HPV presence. Additionally, we analyzed the influence of HPV on the breast adenocarcinoma cell line (MDA-MB-231), which was transfected with HPV-16 E5, E6, and E7 oncogenes and co-cultured with PBMCs, using the following markers: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD56, -CD25, -CD14, -B7.1, -B7.2, -HLA-DR. We also employed intracellular antibodies anti-FoxP3, -perforin, granzyme, -IL-17, -IFN, -IL-10. To specifically identify the MDA-MB-231 lineage, we used the anti-CD44 antibody. We investigated the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- α , and IL-17. RT-qPCR of cDNA from breast tumors and immunophenotyping of cells transfected with E5, E6, and E7 and co-cultured were performed. Regarding the evaluation of the sociodemographic profile, the majority of patients were HPV-positive (64%), breastfed (50%), had children (64%) and were in menopause (42.86%). Gene expression analysis showed that in the presence of HPV, there was lower expression of the STAT4, JAK2, STAT3, and STAT6 genes and higher expression in HPV-negative samples, mainly STAT4, suggesting that HPV may be involved in suppressing the JAK/STAT pathway. FOXO4 expression was higher in HPV-positive samples, indicating that HPV may have a pro-tumor role in breast cancer. An increase in the number of CD4+ T cells was observed when stimulated with untransfected and transfected MDA-MB-231, especially with a Treg profile. Furthermore, pro-inflammatory intracellular cytokines such as IFN- γ , TNF- α , and IL-17 were affected by transfected cells, and a decrease in the cytolytic activity of CD8+ and CD56+ lymphocytes was also observed in the presence of HPV oncogenes, mainly with E6 and E7 in NK cells and E5 in CD8+ T cells. In conclusion, HPV E5, E6, and E7 oncogenes may play a role in regulating the number and function of lymphocytes and monocytes.

Keywords: Breast cancer; HPV; Tumor microenvironment; Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas de incidência e mortalidade de câncer no mundo em mulheres, em 2022.	17
Figura 2	Resumo esquemático com os principais tipos e subtipos de acordo com a classificação histológica do câncer de mama	18
Figura 3	Resumo esquemático com os principais tipos de acordo com a classificação Molecular do câncer de mama.	19
Figura 4	Representação esquemática do genoma do HPV evidenciando os genes de expressão precoce (E), tardia (L) e a região longa de controle (LCR)	24
Figura 5	Principais agentes infecciosos causadoras de câncer em todo o mundo por sexo (%)	26
Figura 6	Proporção de cânceres atribuíveis a infecções (%), por país.	27
Figura 7	Representação do microambiente tumoral e seus principais componentes	29
Figura 8	Representação de receptores de citocinas sinalizando através da via JAK-STAT	35
Figura 9	Grupos de células transfectadas	45
Figura 10	Expressão de fatores de transcrição	49
Figura 11	Curva Cq e Melting referente à expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 utilizados para transfectar células MDA-MB-231	50
Figura 12	Estratégias de <i>gate</i> de linfócitos e células MDA-MB-231	51
Figura 13	Perfil de estimulação de linfócitos T CD4+ cultivados com linhagem tumoral MDA-MB 231	52
Figura 14	Perfil de estimulação de linfócitos T CD8+ cultivados com a linhagem tumoral MDA-MB 231	53
Figura 15	Citocinas intracelulares produzidas por linfócitos CD8+ e CD56+ contra células tumorais	54
Figura 16	Perfil de estimulação de monócitos CD14+ cultivados com linhagem de células tumorais MDA-MB-231	55
Figura 17	Citocinas produzidas nos sobrenadantes de culturas de linfócitos e células tumorais	56
Figura 18	Citocinas produzidas nos sobrenadantes de culturas de monócitos e células tumorais	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento (T.a.).	41
Tabela 2	Marcadores utilizados para imunofenotipagem	46
Tabela 3	Relação entre a presença do HPV e a estimativa do <i>odds ratio</i> de acordo com as seguintes características: idade, tabagismo, amamentação, menarca, menopausa e nuliparidade e detecção do HPV.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Antigen Presenting Cells
CAF	Cancer Associated Fibroblasts
CIS	Carcinomas <i>in situ</i>
CM	Câncer de mama
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	Early
EBV	Vírus Epstein-Barr
EMT	<i>Extracellular Matrix</i>
EV	Extracellular vesicle
FOXO	Forkhead (classe “o”)
HCMV	Human Cytomegalovirus
HER 2	Human Epidermal growth fator 2
HHV-8	Human Herpesvirus type 8
HPV	Human papillomavirus
hr-HPVs	High risk- HPVs
HSV	Herpes “simplex” virus
IC	Invasive Carcinoma
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK	Janus Kinase

L	Late
LCIS	Lobular Carcinoma <i>in situ</i>
LCR	Long Control Region
LB	Linfócitos B
LT	Linfócitos T
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteinases de Matriz
MHC	Major Histocompatibility Complex
NK	Natural Killers
pb	pares de bases
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PIM	Post-infection microenvironment
PRR	Pattern Recognition Receivers
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription proteins
TAM	Tumor-associated Macrophages
Th	T helper
TILs	Tumor-infiltrating Lymphocytes
TME	Tumor Microenvironment
TNBC	Triple-negative Breast Cancer
TNF	Tumor Necrosis Factor
TTN	Tumores triplo-negativos

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CÂNCER DE MAMA	16
2.1.1	Fatores de risco associados ao câncer de mama	21
2.1.2	Câncer de mama e infecção por HPV	21
2.2	<i>PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)</i>	23
2.2.1	Associação entre HPV e diferentes tipos de câncer	26
2.3	MICROAMBIENTE TUMORAL	28
2.3.1	Microambiente tumoral na presença do HPV	31
2.3.2	Microambiente tumoral e câncer de mama	32
2.3.3	Marcadores moleculares para estudo do Microambiente Tumoral	34
3	OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	METODOLOGIA	39
4.1.1	Amostras Biológicas	39
4.1.2	Detecção do DNA viral	39
4.1.3	Extração de RNA	40
4.1.4	Síntese de cDNA	40
4.1.5	PCR quantitativa em tempo real	40
4.1.6	Análises Estatísticas	41
4.2.1	Linhagem celular	42
4.2.2	Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	42
4.2.3	Produção e transfecção de oncoproteínas de HPV	43
4.2.4	Transfecção de oncoproteínas do HPV	43
4.2.5	Estimulação <i>in vitro</i> de PBMC	44
4.2.6	Imunofenotipagem de PBMCs estimuladas <i>in vitro</i> com células tumorais e investigação das citocinas produzidas no sobrenadante da cultura	45
4.2.7	Análise estatística	46

5	RESULTADOS	47
5.1	PERFIL DAS PACIENTES	47
5.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	48
5.3	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	49
5.3.1	Confirmação da transfecção a partir da expressão dos oncogenes	49
5.3.2	Estratégia de <i>gate</i>	50
5.3.3	Perfil de estimulação de linfócitos T CD4+	51
5.3.4	Estimulação citotóxica de linfócitos T CD8+	52
5.3.5	Perfil de citocinas intracelulares de linfócitos T CD8+ e CD56+	53
5.3.6	Perfil de estimulação de monócitos CD14+	54
5.3.7	Citocinas liberadas nos sobrenadantes dos grupos experimentais	55
6	6. DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	63
8	REFERÊNCIAS	64
ANEXO A	PUBLICAÇÕES PRODUZIDAS DURANTE O DOUTORADO	77
ANEXO B	PUBLICAÇÕES EM ANDAMENTO	81

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma neoplasia que representa um problema de saúde pública, com incidência mundial de 11,7%, seguido pelo câncer de pulmão com incidência de 11,4%, e o mais frequente em mulheres, representando 25,4% de todos os tipos de câncer. Em 2020, 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, com uma taxa de mortalidade de 685.000 em todo o mundo. Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), em 2022, o Brasil teve uma incidência de 73.610 casos desse tipo de câncer, e 17.825 de mortes associadas. Existem alguns tipos de classificação para o câncer de mama, como a histológica e molecular.

A relação entre fatores genéticos hereditários e esporádicos e a etiologia do câncer de mama tem sido estabelecida. No entanto, esse câncer está principalmente associado a vários fatores ambientais e comportamentais, como a exposição prolongada ao estrogênio devido à menarca precoce, nuliparidade, menopausa tardia, exposição a altas doses de radiação ionizante, consumo regular de álcool e uma dieta rica em gordura. Além desses fatores, as infecções virais também podem estar associadas à carcinogênese mamária, incluindo aquelas causadas por oncovírus, como os papilomavírus humanos de alto risco (hr-HPVs). O processo de carcinogênese de vários tipos de câncer, incluindo cervical, anal, vulvar, vaginal, peniano e orofaríngeo, e a influência de células imunológicas, pode estar associado a infecções persistentes por hr-HPV.

O HPV já foi detectado em vários tipos de câncer não anogenital, como câncer de orofaringe, cabeça, pescoço, pulmão e mama. Até o momento, nove tipos de HPVs (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 52) foram identificados em amostras de tumores de mama de diferentes populações do mundo. Existem três vias hipotéticas pelas quais o HPV atingiria o tecido mamário, (I) através do sangue em pacientes com câncer cervical ou por metástase, uma possível transformação maligna secundária derivada de um tumor primário em outro órgão. (II) através de práticas sexuais orais e microlesões na pele da mama ou do mamilo, (III) através da atividade das vesículas extracelulares (EVs).

Apesar da relação estabelecida entre o HPV e o câncer do colo do útero, a possível ligação entre esse agente infeccioso e outros tipos de câncer, como o de

mama, ainda requer mais estudos. Recentemente, foi observado que a infecção pelo HPV pode contribuir para a quimiorresistência no câncer de mama através de genes envolvidos na apoptose celular. Adicionalmente, foi observado, *in vitro*, um remodelamento do microambiente após a infecção pelo HPV e das células nele inseridas, proporcionando um microambiente pós-infecção (PIM) com características imunossupressoras, levando à persistência viral e possível desenvolvimento neoplásico. Além disso, o conjunto de células imunes circundantes, vasos sanguíneos, matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea e moléculas de sinalização, como membros da família das interleucinas, que fazem parte do microambiente tumoral, pode afetar a progressão e o desenvolvimento do câncer.

Neste sentido, uma melhor caracterização tumoral, baseada na expressão gênica e no estudo do mecanismo de resposta imunológica contra o tumor, pode fornecer informações importantes sobre o desenvolvimento do câncer, os graus de progressão e possíveis alvos para estratégias de imunoterapia. Neste estudo, considerando que o HPV pode alterar o microambiente tumoral e já foi detectado em tumores de mama, investigamos possíveis alterações em linhagem celular de adenocarcinoma de mama transfectada com oncoproteínas do HPV16 e o papel das células imunes na resposta a esse alvo *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

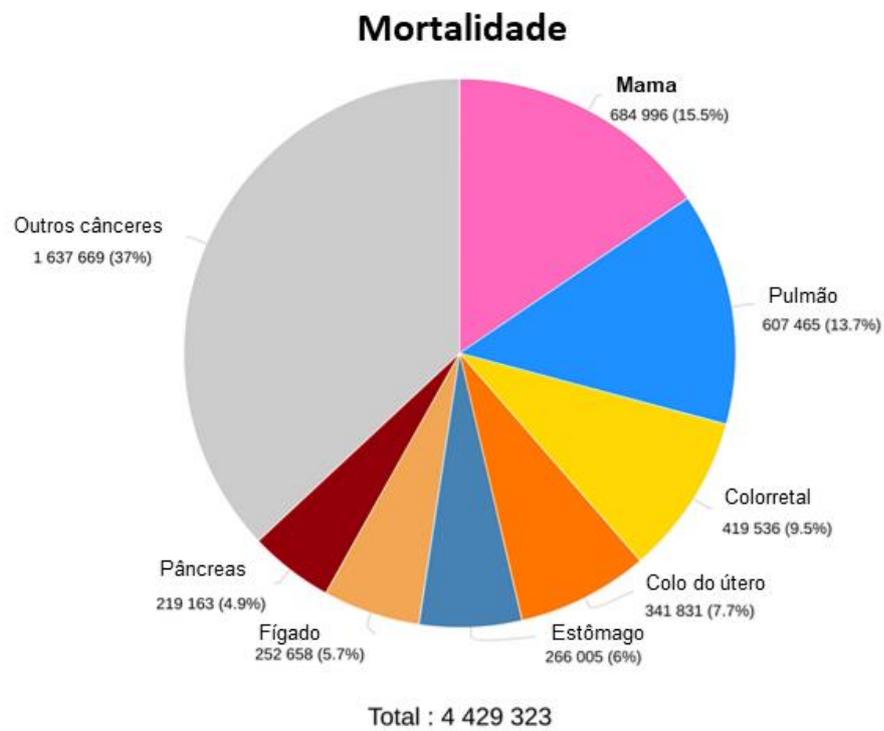
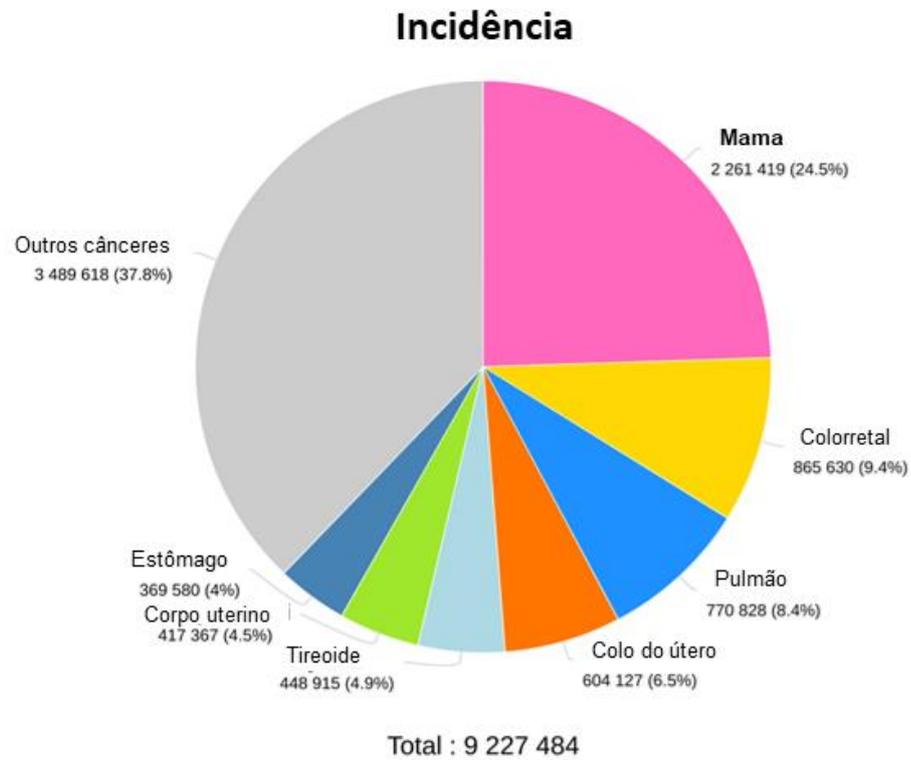
2.1 CÂNCER DE MAMA

No ano de 2020, aproximadamente 2,3 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama e cerca 685.000 chegaram a óbito, em todo o mundo (Figura 1). Entre 2015 e 2020, ou seja, num período de cinco anos, 7,8 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama, tornando-o o câncer mais prevalente no mundo (WHO, 2021).

Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), no ano de 2022, o Brasil apresentou incidência de 73.610 novos casos e 17.825 mortes entre mulheres (INCA, 2022). No período 2016-2020, os óbitos por câncer de mama ocuparam o primeiro lugar no país, representando 16,3% do total. As regiões do país seguem esse mesmo padrão, exceto a região Norte, onde os óbitos por câncer de mama ocupam o segundo lugar, com 13,6%. Os maiores percentuais de mortalidade por câncer de mama são do Sudeste (17,2%) e Centro-Oeste (16,8%), seguidos pelo Nordeste (15,6%) e Sul (15,5%).

Nas últimas décadas, essa taxa de mortalidade tem se acentuado em todas as regiões do Brasil, com exceção das regiões Sul e Sudeste (INCA, 2022). O Estado de Pernambuco apresentou uma taxa de mortalidade estimada de 12,35 casos para cada 100 mil mulheres, para o ano de 2020. A estimativa para o ano de 2023 é de 2.880 casos (INCA, 2023).

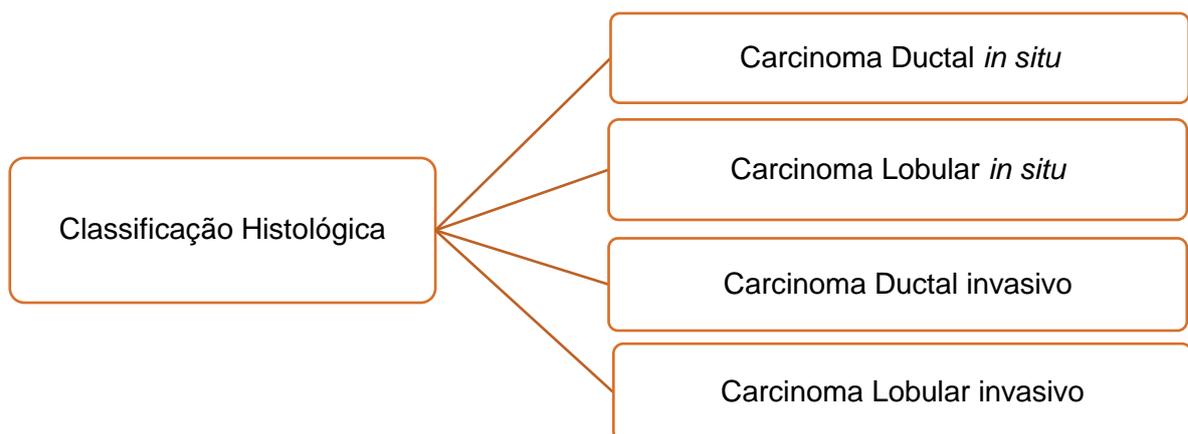
Figura 1 – Taxas de incidência e mortalidade de câncer no mundo em mulheres, em 2022.



Fonte: GLOBOCAN, 2022.

O câncer de mama possui vários subtipos biológicos que refletem um perfil molecular variado e características clinicopatológicas distintas. Os tumores de mama podem ser classificados histologicamente de acordo com seu padrão de crescimento patológico (WHO, 2021). Os carcinomas *in situ* subdividem-se em carcinoma lobular *in situ* (LCIS) e carcinoma ductal *in situ* (DCIS) (figura 2). A proliferação de células pequenas de baixa aderência em um ou mais ductos ou alvéolos terminais, caracteriza o LCIS (Logan et al., 2015). Esses tipos podem ser especiais (ex. mucinoso, papilar) ou não especiais (ex Ductal, lobular) (Aatish Thennavan et. al., 2021).

Figura 2 - Resumo esquemático com os principais tipos do câncer de mama de acordo com a classificação histológica.



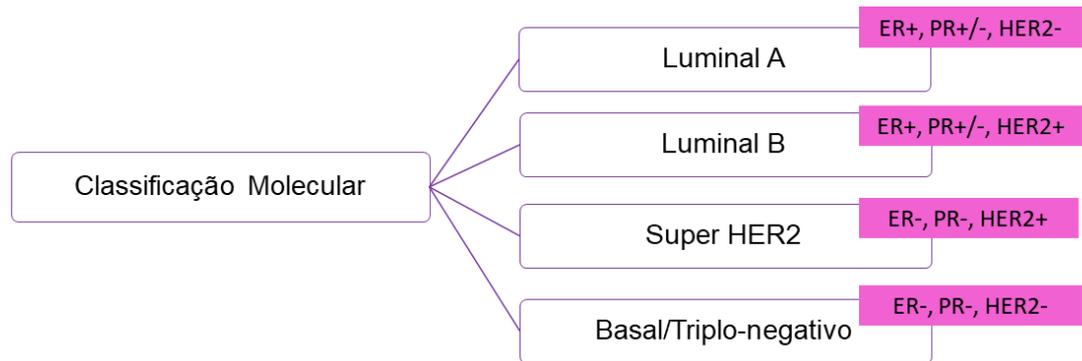
Fonte: A autora (2023)

Existem mais de 60 tipos histológicos de tumores da mama e mais de 20 tipos de câncer de mama invasivo. O mais comum é o Carcinoma Ductal Invasivo (CDI), que tem origem nos ductos mamários, sendo classificado, pela morfologia em graus (1, 2 ou 3) (Gobbi et. al., 2012). O CDI é responsável por 70% a 80% de todos os cânceres invasivos, seguido por carcinomas lobulares invasivos (CLI) (cerca de 10% de todos os cânceres). O restante são os tipos histológicos menos comuns, como mucinoso, cribriforme, micropapilar, papilar, tubular, carcinomas medulares, metaplásicos e apócrinos (WHO 2012).

Além dos subtipos histológicos, o câncer de mama é classificado em diferentes subtipos moleculares (figura 3). Estudos de perfil de expressão gênica

classificaram os cânceres de mama em 4 subtipos: Luminal A, Luminal B, super HER-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 positivo) e Basal/triplo negativo (TNBC) (Dharambir et. al., 2022).

Figura 3 - Resumo esquemático com os principais tipos de acordo com a classificação Molecular do câncer de mama.



Fonte: A autora (2023)

O subtipo molecular luminal A, na sua maioria, são tumores que apresentam receptor de estrogênio positivo e baixo grau histológico. Classificam-se como luminais A, os tumores positivos para receptor de estrogênio (RE), e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (Cirqueira et. al., 2011; Tsang et. al., 2020).

Os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A. A expressão de RE, RP e HER2 distinguem o subtipo luminal A do luminal B (Cirqueira et. al., 2011; Tsang et. al., 2020).

Em consenso os subtipos de carcinoma invasivo relevantes para a escolha do tratamento, com base no receptor de estrogênio (ER) e status HER2, além de novos dados que são adicionados para apoiar as diferenças na patogênese, resposta ao

tratamento e prognóstico desses agrupamentos clinicamente relevantes (Wysocka et. al., 2020).

O subtipo super HER2, como o próprio nome indica, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais. Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa expressão gênica. A positividade de HER2 parece estar associada relativamente, mas não em absoluto, à resistência às terapias endócrinas. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que melhora as taxas de resposta, reduz a progressão da doença e melhora a sobrevida quando utilizado isoladamente ou adicionado à quimioterapia em câncer de mama metastático (Cirqueira et. al., 2011).

O subtipo basal caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais demonstra padrão prognóstico mais reservado e a menor sobrevida global. Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pelo destacado infiltrado linfocitário (Cirqueira et. al., 2011). Apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER2. Espera-se assim, que pacientes com esse perfil, não se beneficiem do uso do trastuzumabe, nem de terapias hormonais, como o tamoxifeno, e nem dos inibidores de aromatase. Os tumores basaloides têm baixa expressão do gene BRCA1, causada por metilação de seu gene – promotor, por inativação de transcrição de BRCA1, ou por ambos (Waks et. al., 2019).

2.1.1 Fatores de risco associados ao câncer de mama

O câncer de mama em mulheres ocorre em todos os países do mundo, com maior frequência em qualquer idade após a puberdade, com taxas crescentes na vida adulta, porém, seus riscos podem variar. A incidência do câncer de mama é maior entre mulheres de países de alta renda do que em países de baixa renda (The Cancer Atlas, 2023).

A etiologia do carcinoma mamário é multifatorial e o risco de seu desenvolvimento envolve fatores individuais, ambientais, endócrinos e epigenéticos. Estudos epidemiológicos correlacionaram diferentes fatores para o desenvolvimento ou progressão do risco de câncer de mama. Os principais fatores consistem em: pertencer ao sexo feminino e possuir idade avançada (Oliveira et. al., 2016). Outros fatores incluem a exposição a radiações ionizantes, consumo de álcool, tabagismo, obesidade e o sedentarismo (San et. al., 2017; Souza et. al., 2019). Fatores de risco, incluindo idade tardia para o início de relações sexuais, primeiro filho e menopausa, estão fortemente associados ao desenvolvimento da doença (Yi-Sheng, et. al., 2017).

A hereditariedade é responsável por cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama. Dois biomarcadores bem estabelecidos são genes BRCA1 e BRCA2 apresentando mutações, esses genes estão relacionados com a ativação e regulação transcricional, reparo de danos no DNA e controle do ciclo celular. Estes, quando inativados, podem levar ao desenvolvimento de tumor mamário de médio e alto grau histológico. Com relação ao *status* hormonal, sabe-se que o estrogênio tem um importante papel no câncer de mama ao induzir o crescimento das células do tecido mamário, aumentando o potencial de alterações genéticas e, conseqüentemente, o desenvolvimento do tumor (Yi-Sheng, et. al., 2017).

2.1.2 Câncer de mama e infecção por HPV

Os vírus são considerados um interessante fator de risco etiológico, mas controverso, para o câncer de mama, que pode atuar em conjunto com outros fatores. Há evidências de que o DNA viral de HPV, vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus humano (HCMV), vírus herpes simplex (HSV) e herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) podem ser encontrados em amostras de câncer de mama, bem como

em amostras de tecidos saudáveis. A associação entre o HPV e o câncer de mama ainda vem sendo estudada. Existem dados conflitantes sobre a presença de DNA do HPV em amostras de câncer de mama, e não temos um modo exato e esclarecido de como ocorre a transmissão do HPV para a mama (Kudela et. al., 2022).

De acordo com a primeira hipótese, o HPV é transmitido às glândulas mamárias por via linfática ou sanguínea em mulheres com displasias cervicais. No caso de malignidade, as células de um tumor primário podem ser transportadas pelo fluxo de plasma. Além disso, os vírions do HPV podem ser transferidos do local da infecção inicial para outros órgãos (Pao et. al., 1997). Já na segunda hipótese, De Villiers e colaboradores afirmam que o HPV pode infectar a glândula mamária através da pele do mamilo. Como os ductos de leite são abertos, podem servir como porta de entrada para infecção viral e, portanto, o risco de infecção pelo HPV é maior quando expostos ao ambiente externo. A forma mais comum de transmissão do HPV é o contato sexual, com o vírus entrando potencialmente através de fissuras nos mamilos ou por contato manual entre o períneo feminino e a mama durante a relação sexual (Kudela et. al., 2022).

A terceira hipótese é baseada na atividade das vesículas extracelulares (EVs), pois foi encontrado DNA do HPV em VE derivadas do soro de mulheres com câncer de mama. Estas vesículas, possivelmente transferem DNA do HPV para as células do estroma do câncer de mama, que adquirem um fenótipo inflamatório ativado. (De Carolis et. al., 2019). O padrão ascendente de disseminação da infecção pelo HPV ainda é alvo de discussão. A maioria dos genomas de HPV (86-100%) detectados no tecido mamário está de forma integrada com baixo número de cópias (0,00054-9,3 cópias/célula). No câncer de mama, suspeita-se que o HPV desempenhe apenas um papel indireto nessas malignidades devido à baixa carga viral (Islam et. al., 2020).

Mudanças moleculares na iniciação do câncer de mama podem, portanto, ocorrer por meio de um mecanismo de "hit and run". Esta teoria propõe que o HPV inicia ou contribui para o desenvolvimento do câncer, mas em alguns casos desaparece das células tumorais (possivelmente devido à vigilância imunológica) antes que a doença seja diagnosticada. O possível papel do HPV como mediador ou

cofator em uma relação causal continua na perspectiva de ser determinado por pesquisas futuras (Balci et. al., 2019).

Os oncogenes E6 e E7 do HPV foram identificados em amostras de câncer de mama (CM), sugerindo que o HPV pode estar envolvido em sua promoção. O mRNA de E6/E7 foi encontrado em amostras de CM positivas para HPV. Um estudo conduzido por Haghshenas e colaboradores (2016), revelou que 23,6% dos casos de câncer de mama foram infectados pelo HPV. O estudo de Muhammad (2022), investigou a correlação entre HPV e câncer de mama e apesar dos resultados não serem conclusivos, sugeriram o HPV como um agente causa-efetivo ou pelo menos um co-participante na patogênese do câncer de mama.

Um número significativo de estudos recentes relatou que aproximadamente 29% dos tecidos de câncer de mama humano eram positivos para subtipos de HPV de alto risco, especialmente subtipos de HPV 16, 18 ou 33. Avanços recentes nas metodologias laboratoriais visam superar os desafios inerentes à detecção do HPV no tecido do câncer de mama (Wang et. al., 2012).

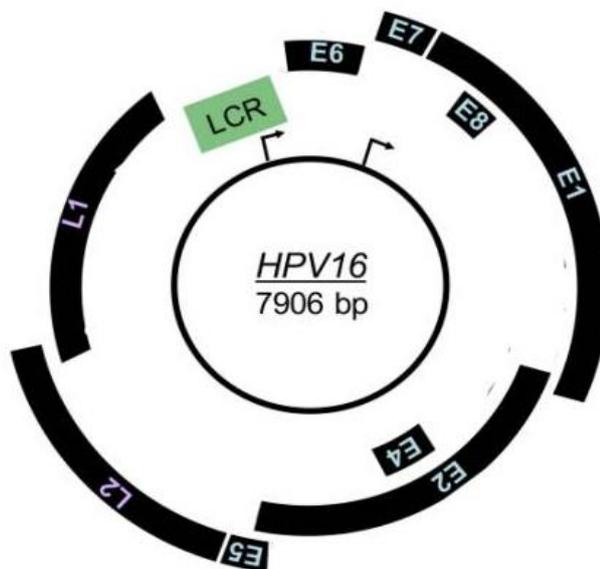
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O HPV é um vírus de DNA, pertencente à família Papillomaviridae, não envelopado, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases (pb) (Tan et al., 1998). Este tipo de vírus infecta as células mucosas ou cutâneas, no tecido epitelial, através de microlesões, sendo o contato sexual sua principal forma de transmissão (Souto et al., 2005).

O genoma do HPV é composto pela região LCR (Long Control Region – Região Longa de Controle) região reguladora não codificadora de aproximadamente 1 kb, onde se encontram as sequências regulatórias da transcrição viral e origem de replicação dos genes *Early* (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e *Late* (L1 e L2) (Figura 4), sendo assim denominados pela ordem de expressão dos mesmos (Favre & Orth, 1997). Os genes designados como E (*early*) são comumente expressos desde os primeiros estágios da infecção e estão relacionados a funções regulatórias, como controle de transcrição e replicação virais, e transformação celular, enquanto a

expressão dos genes L (*late*) somente é detectada nos estágios finais de infecção, e estão envolvidos na composição do capsídeo viral (Favre & Orth, 1997).

Figura 4. Representação esquemática do genoma do HPV evidenciando os genes de expressão precoce (E), tardia (L) e a região longa de controle (LCR).



Fonte: Harden 2017.

O gene E1 codifica uma proteína que se liga na origem de replicação viral, apresentando uma atividade de helicase para separação de cadeias de DNA. A proteína E2 liga-se a E1 e estimula a replicação do DNA viral. E2 regula a distribuição de genomas virais para cada célula filha após a divisão celular (Jimenez, 2015). A proteína E4 é expressa em uma fase posterior da infecção viral e atua facilitando na liberação do virion no tecido epitelial escamoso. E4 também prende as células na fase G2 do ciclo celular. E5 estimula a atividade transformadora do receptor do fator de crescimento epidérmico resultante no aumento da proliferação celular (Jimenez et al., 2015).

As proteínas E6 e E7 do HPV são conhecidos por induzir a degradação dos genes supressores de tumor p53 e pRb, respectivamente. Elas podem suprimir apoptose e alterar a função dos fatores envolvidos na regulação do ciclo celular, facilitando assim prolongamento do estágio proliferativo da diferenciação dos queratinócitos (Etzet et. al., 2010). A atividade transformante dos HPVs de alto risco é promovida pelas oncoproteínas E6 e E7. Os produtos desses oncogenes são importantes para os processos de transformação e imortalização celular. As

proteínas supressoras de tumores presentes na célula como a pRb e a p53 são alvo da ação transformante desses oncogenes. A atividade da pRb é inibida pela oncoproteína viral E7, por outro lado, a p53 é degradada subsequentemente à ligação com a oncoproteína E6. Ambas oncoproteínas induzem a proliferação, imortalização e transformação maligna das células infectadas pelo vírus (Tan et al., 1998).

As oncoproteínas E6 e E7 são as duas proteínas oncogênicas mais importantes para a carcinogênese cervical, e são conhecidas por ativar vias 24 oncogênicas e reprimir as vias de supressão tumoral, o que resulta em desregulação do ciclo celular do hospedeiro e crescimento celular desordenado (Hatano et al., 2017). A proteína p53 tem a habilidade de perceber diferentes tipos de estresses que as células podem sofrer, com consequentes danos no DNA. Dessa forma, esta proteína é responsável por ativar os genes de mecanismo de reparo do DNA ou sinalizar para apoptose (Ribeiro-Silva et al., 2003).

Quando presente na célula, a oncoproteína viral E6 recruta a proteína de associação a E6 (E6-AP), um polipeptídeo celular que tem atividade de ubiquitina ligase, e este recrutamento resulta na ubiquitinação e degradação de p53 (Stubenrauch e Laimins, 1999), assim, a degradação de p53 passa a ser mediada por E6/E6-AP (Bernard et. al., 2011), logo E6 atua inibindo a apoptose e possíveis reparos no DNA. Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos no DNA, havendo um aumento na frequência de mutações, aneuploidias e rearranjos cromossômicos. O acúmulo desses eventos propicia o desenvolvimento de um fenótipo neoplásico resultando em câncer (Vousden, 1993; Vogel e Syrowatka, 2000).

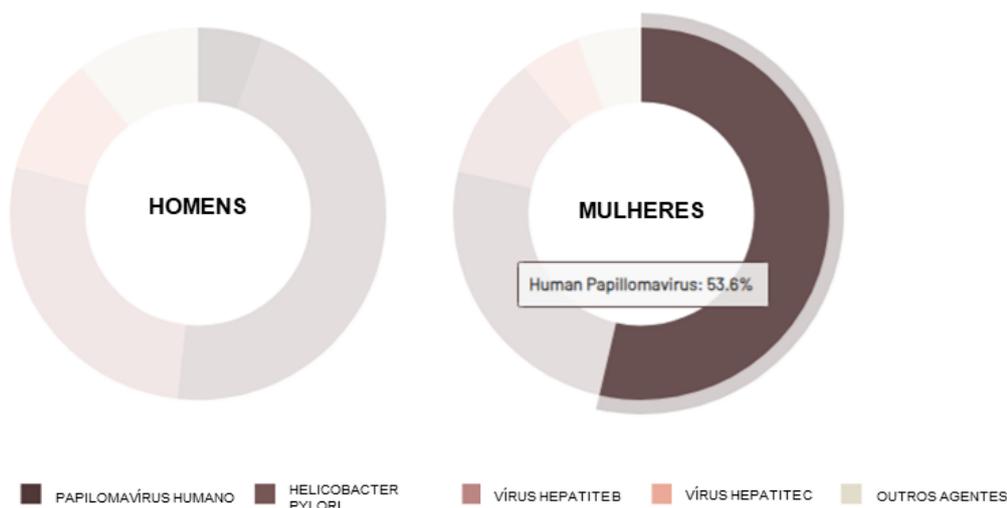
O HPV-16 é considerado o responsável por 50 a 60% dos casos de câncer cervical, seguido pelo HPV-18 (10-12%), e os HPVs 31 e 45 (4-5% cada) (Bosch & Sanjose, 2003; Trottier & Franco, 2006). Taxas de prevalência do HPV e tipos diferem por grupo étnico, e os genótipos dos HPVs variam por áreas geográficas, e essa distribuição tem sido utilizada como objeto de diversos estudos. O HPV-16 apresenta uniformidade em sua distribuição, além de maior prevalência mundial, seguido pelo HPV-18 ou 31, de acordo com a região estudada (Bosch et al., 1995; Clifford et al., 2005; Walboomers et al., 1999).

O HPV-16 é o mais predominante no Brasil, entretanto, o segundo mais predominante e varia por região (Baldez da Silva et al., 2009; Castro et al., 2011; Chagas et al., 2013; Cruz et al., 2004; Fernandes et al., 2011). Em Recife, o HPV16 segue o padrão de frequência mundial, no entanto, o HPV-31 é o segundo mais frequente (15,49%), seguidos pelos tipos 33, 58 e 18 (Baldez da Silva et al., 2009; Lorenzato et al., 2000). Diferenças na distribuição dos HPVs podem advir tanto pelo processo de migração de pessoas, que gera uma maior diversidade populacional, quanto por comportamentos sexuais (Bosch et al., 1995; Barzon et al., 2008).

2.2.1 Associação entre HPV e diferentes tipos de câncer

No mundo, diversos agentes infecciosos são causadores de vários tipos de câncer, como uma cepa do *Helicobacter pylori* que está relacionada ao câncer de estômago, vírus da hepatite B e vírus da hepatite C ambos relacionados ao hepatocarcinoma, que juntos com o HPV relacionado ao câncer cervical, representam mais de 90% de todos os cânceres relacionados com infecções, em ambos os sexos. Já em mulheres, o HPV representa 53,3% dos cânceres causados por infecções (figura 5). (The Cancer Atlas, 2023).

Figura 5. Principais agentes infecciosos causadoras de câncer em todo o mundo por sexo (%)



Fonte: Adaptado de The Cancer Atlas, 2023.

No Brasil, 11,1% dos casos de câncer estão atribuídos a infecções (figura 6) (The Atlas Cancer, 2021). Existe uma relação bem estabelecida entre o HPV e os cânceres de colo uterino, região anogenital, cabeça e pescoço e pele. Uma variedade de outros tipos de câncer foi relatada como associada ao HPV, incluindo glioblastoma, câncer colorretal, de pulmão e de mama, entretanto, seu papel patogênico permanece ambíguo e controverso no câncer de mama (Xiong et. al., 2017).

Figura 6. Proporção de cânceres atribuíveis a infecções (%), por país.



Fatores de risco

Proporção de mortes por câncer associadas ao álcool (%)

8.7

Prevalência de homens fumantes (%)

15.4

Prevalência de mulheres fumantes (%)

8.9

Proporção de cânceres atribuídos a infecções (%) por país

11.1

Fonte: Adaptado de The Cancer Atlas, 2023.

O HPV-16 é o genótipo mais comum detectado em tumores benignos e de câncer de mama. Além disso, a incidência de variantes do HPV-16 é diferente entre os cânceres de colo do útero e de mama, indicando as possíveis variantes específicas do tecido do HPV16. Os tipos de HPV mais comuns, associados a 70% de todos os casos de CM em todo o mundo, são os tipos de HPV 16, 18 e 33, no entanto, a presença de tipos de baixo risco (HPV6, 11, 23 e 124) também foi relatada (Islam et. al., 2018; Szymonowicz et. al., 2020).

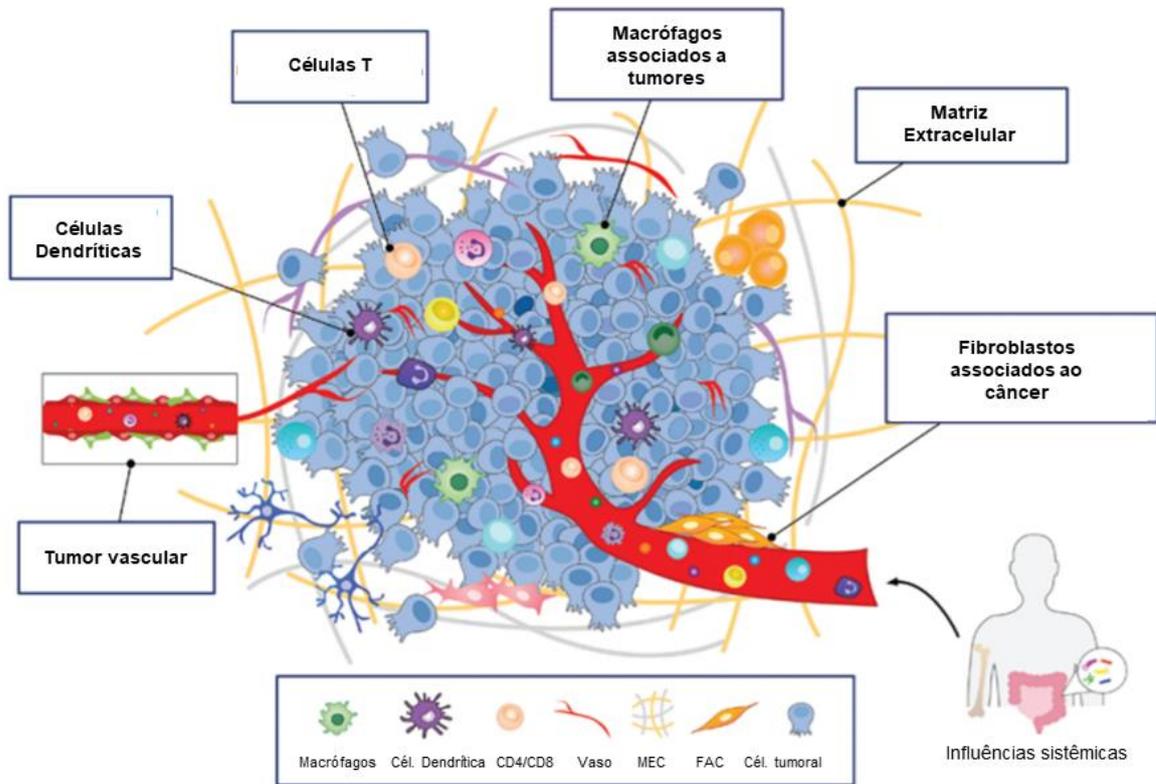
Muitos estudos indicam que células infectadas por HPVs ativamente remodelam o meio local atuando em conjunto com células residentes normais e induzindo a formação de um microambiente pós-infecção de suporte e

imunossupressor, apoiando assim a persistência viral, propagação e promovendo a patogênese de neoplasia cervical (Yuan et. al., 2020).

2.3 MICROAMBIENTE TUMORAL

O TME (Microambiente Tumoral) é definido como um rico e complexo ambiente multicelular em que um tumor se desenvolve. O TME normalmente compreende células imunes, incluindo linfócitos T e B, macrófagos associados a tumores (TAM), células dendríticas (DC), células “Natural Killers” (NK), neutrófilos e células supressoras derivadas de mielóide (MDSC), células do estroma, como as fibroblastos associados ao câncer (CAF), células estromais mesenquimais, a matriz extracelular (MEC) e outras moléculas secretadas, como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, vesículas extracelulares e os vasos sanguíneos e linfáticos, que estão coletivamente emaranhadas e em comunicação umas com as outras e com próprias células do câncer, ou seja, é um microambiente bastante heterogêneo (Figura 7) (Berajano et. al., 2021).

Figura 7. Representação do microambiente tumoral e seus principais componentes.



Fonte: Berajano 2021.

Os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK são as principais células efetoras da imunidade inata, os quais estão associados à fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento e síntese de citocinas e quimiocinas. Por outro lado, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas. Os principais papéis da resposta imune adaptativa consistem em: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (Abbott et. al., 2019). Apesar de as principais células envolvidas na resposta imune adaptativa sejam os linfócitos, as células apresentadoras de antígenos (APCs) desempenham papel fundamental em sua ativação, apresentando antígenos associados a moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), para os linfócitos T (LT) (Cruvinel et. al., 2010; Laskowski et. al., 2022).

As citocinas são os principais reguladores da imunidade inata e adaptativa. Citocina é o nome geral dado a qualquer proteína que é secretada por células e que afeta o comportamento das células vizinhas portadoras de receptores adequados. As quimiocinas são proteínas secretadas que atuam como quimioatraentes (daí o nome "quimiocina"), atraindo as células portadoras de receptores de quimiocinas (Janeway, 2014). Ambas classificam-se em pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β) (Zhang et al. 2020; Zhao et al. 2021).

No câncer cervical, existe maior expressão das citocinas IL-10, IL-17, IL-23 e TGF- β , principalmente quando infectadas com HPV de alto risco (Lina Zhang, 2020). E as citocinas IL-8, IL-1 β , IL-10, IL-21 e TNF- α estão associadas à progressão das lesões pré-cancerosas no câncer cervical (Long et al. 2021). Estudos a respeito do câncer de mama indicam níveis séricos significativamente maiores de IL-6, IL-8 e IL-10 em pacientes com esse tipo de câncer (Ma et. al., 2017; Lippitz et. al., 2013).

A modulação de algumas moléculas expressas em APCs também vem sendo associada ao câncer. Como é o caso da expressão de HLA-DR em tumores, que tem sido positivamente associada ao aumento da infiltração de linfócitos, e sua expressão pode ser induzida em células epiteliais e células tumorais em resposta a condições inflamatórias. O HLA-DR é expresso em uma variedade de APCs, incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B (Dunne et. al., 2020). As moléculas coestimuladoras B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86), também são expressas em APCs. Essas moléculas podem desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento das respostas imunológicas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2) (Clavreul et. al., 1998).

As células *Natural Killer* (NK) representam uma importante linha de defesa inespecífica, reconhecendo e lisando células infectadas por vírus, bactérias e protozoários, bem como células tumorais. Estas células recrutam neutrófilos e macrófagos, ativam DCs e linfócitos T e B. A expansão e a ativação das NKs são estimuladas pelas IL-15, produzida por macrófagos, e pela IL-12, indutor potente da produção de IFN- γ e ação citolítica. Uma vez ativadas, as NKs lisam células infectadas e tumorais e secretam citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2 e principalmente IFN- γ) (Cruvinel et. al., 2010).

2.3.1 Microambiente tumoral na presença do HPV

Um estudo indica que células infectadas por HPVs remodelam o meio em conjunto com células residentes normais e induzem a formação de um microambiente pós-infecção (PIM) e imunossupressor, apoiando assim a persistência viral, propagação e promovendo a progressão da neoplasia cervical (Yuan et. al., 2020).

Os HPVs têm empregado várias estratégias para interferir em múltiplas vias de sinalização em queratinócitos infectados e evitar mecanismos de vigilância. Os queratinócitos em seguida, se comunicam com os componentes locais por meio de seus fatores moleculares regulados, criando assim um cenário propício à promoção, iniciação e estabelecimento deste microambiente. Após a detecção de patógenos, os Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR) transduzem cascatas de sinalização para iniciar a transcrição e secreção de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos. Estudos *in vitro* mostraram que E6 e E7 de hrHPVs interferem com tais sinais ao interagir com fator de transcrição regulador de interferons para inibir sua transcrição e induzir a enzima de Ubiquitina C-Terminal Hidrolase L1 (UCHL1) para limitar a ativação do fator associado ao receptor de TNF (TRAF3) (Conlon et. al., 2019). Além disso, a oncoproteína E5 do HPV16 pode limitar a indução de IFN- κ que é expresso constitutivamente em queratinócitos em repouso, principalmente através do amortecimento da via TGF- β e aumento da sinalização MAPK (Yuan et. al., 2020).

Os queratinócitos basais mostram uma forte expressão de IL-6, indicando um mecanismo autócrino sobre as células que abrigam o vírus. Além disso, a oncoproteína E2 do HPV16 induz alta atividade promotora de IL-10 em células infectadas pelo vírus. Ao todo, essas vias interferentes e fatores secretados promovem a formação de um microambiente alterando a característica dos queratinócitos primários, interferindo com mediadores imunológicos e instruindo mudanças no estroma que facilitam a progressão maligna (Dethlefsen, 2013).

Moléculas derivados de células infectadas por vírus, como IL-6, IL-10, VEGF e PGE2, podem recrutar células imunes reguladoras e supressoras para os locais infectados. Lesões cervicais hrHPV+ mostram um aumento da infiltração de

Macrófagos Associados a Tumores (TAMs), CD163+ CD68+ com menor produção de IFN- γ e capacidade restrita para aumentar a proliferação de células T (Conlon et. al., 2019).

A infecção persistente por HPVs força as células NK ativadas a regular negativamente seus receptores de membrana, como NKp30, NKp44, NKp46 e NKG2D, levando a um comprometimento da atividade das células NK. Ambas oncoproteínas E6 e E7 do HPV-16 inibem a produção de IFN- γ dependente de IL-18 em células NK através da supressão da ligação da IL-18 ao seu receptor de cadeia α . IFN- γ é essencial na ativação de células NK e outras células do sistema imunológico, como CD8, NKT e Th1. E a sinalização de IL-18 desempenha um papel crucial na ativação das células NK, já que promove sua expansão e otimiza sua citotoxicidade, e a expressão de CD80, CD86, HLA-DR e HLA-DQ (Gutiérrez-Hoya et. al., 2021).

As células T virgens podem se diferenciar em linfócitos T citotóxicos (CTLs) e migrar para os locais de infecção. Apesar da alta infiltração de células T CD8+ em lesões cervicais, elas não parecem suprimir proliferação de células malignas (Yuan et. al., 2020). Um dos fatores que pode estar relacionado ao comprometimento das respostas dos CTLs, por exemplo, é o fato de que o vírus que abriga os queratinócitos diminui sua expressão de MHC-I na superfície, amortecendo assim o reconhecimento de CTLs. Além dos CTLs, uma resposta robusta de células T CD4+ também é necessária para a eliminação do vírus. Após a ativação, CD4+ pode potencializar a resposta imune celular ou humoral através da ação do T-helper 1 (Th1) e subconjunto Th2, respectivamente. Um desequilíbrio nas respostas do tipo Th1 e Th2 pode contribuir para a desregulação imunológica associada à infecção por HPVs e seu papel no microambiente pós-infecção, caracterizado por uma falta de resposta de dominância Th1 e aumento de Th2 em lesões cervicais hrHPV+ (Yuan et. al., 2020).

2.3.2 Microambiente tumoral e câncer de mama

O microambiente do câncer de mama pode ser considerado a nível local (intratumoral), regional (na mama) e à distância (metastático), cada um dos quais abrange vários tipos celulares como fibroblastos, leucócitos, adipócitos e células

mioepiteliais e endoteliais. Eles também incluem componentes como matriz extracelular (MEC), fatores solúveis (por exemplo, citocinas, hormônios, fatores de crescimento e enzimas) e propriedades físicas (por exemplo, pH e teor de oxigênio) (Arneth et. al., 2019).

A metástase é um processo complexo no qual circulam as células tumorais extravasam através da parede capilar para colonizar um novo microambiente. Recentemente, O RANKL também tem sido associado à formação de metástases via células T reguladoras CD4+ (T reg), sugerindo que a participação de células imunes distintas pode ser necessária para a formação de metástases. Curiosamente, estudos em animais mostraram a possibilidade de multidirecionalidade nas metástases em câncer de mama, com disseminação das células do câncer não apenas do tumor primário até o osso, mas também do osso para outros locais distantes e até mesmo de volta ao local da origem, sugerindo que o microambiente ósseo pode ser um coordenador chave no processo metastático (Soysal et. al., 2015).

Os linfócitos infiltrantes (TILs) de tumores estão emergindo como um dos principais atores no microambiente tumoral. A maioria dos linfócitos infiltrantes tumorais são células T que podem ser divididas em células auxiliares CD4+, T reg com um fenótipo CD4+, CD25+, FOXP3+ e células efectoras, como células NK e células T CD8+. Células T reg normalmente atuam contra doenças autoimunes suprimindo as células T autorreativas, mas no TME, isso se traduz no bloqueio das respostas antitumorais (Arneth, 2019). Elas são capazes de suprimir uma ampla gama de células imunológicas, incluindo células T CD8+, células NK, Células B e APCs. Altos números de T reg estão associados a um pior prognóstico em câncer de mama. Acredita-se que o próprio tumor recruta T reg através da secreção de prostaglandina E2 também como sinalização TGF- β , e suprime as funções das células efectoras através da secreção de IL-10 e TGF- β para criar um microambiente imunossupressor (Soysal et. al., 2015).

Este processo é chamado de imunoedição e tem sido recentemente reconhecido como outra marca registrada do câncer. Por outro lado, a infiltração por células T efectoras CD8+ está associada a maior sobrevida específica para o câncer

de mama, independente de outros fatores prognósticos, como o grau do tumor, estágio do linfonodo, tamanho do tumor, invasão vascular e estado HER2. No entanto, o efeito das células T citotóxicas CD8+ é regulado pelo equilíbrio entre os sinais coestimulatórios e co-inibitórios nos chamados pontos de verificação imunológicos (Soysal et. al., 2015).

As moléculas de sinalização também demonstraram desempenhar um papel significativo na indução e progressão de tumores e na resposta imune contra eles. Considerando a crescente complexidade dos modelos tumorais, é crucial ter uma compreensão biológica completa dos papéis dessas moléculas dentro do TME (Hinshaw et. al., 2019). Embora os mecanismos exatos responsáveis pela tumorigênese e metástase no tecido mamário não sejam totalmente compreendidos, a hipótese de que a inflamação desempenha um papel predominante. A liberação de fatores de crescimento ou citocinas como TGF- β , TNF- α , proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), FGF, fator inibidor de leucemia (LIF) e interleucinas (IL), que por sua vez leva à introdução de células anti-inflamatórias, demonstrou facilitar a formação de tumores (Hinshaw et. al., 2019; Xiao et. al., 2021).

Além de sua contribuição para a tumorigênese, essas moléculas sinalizadoras, das quais a mais proeminente e mais estudada é o TGF- β , desempenham um papel significativo na EMT (Matriz extracelular). A maioria dos tumores humanos (incluindo o câncer de mama) secreta ou induz a secreção de TGF- β , que se acumula no TME (Bahcecioglu et. al., 2020).

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é caracterizada por um processo de transformação, no qual as células epiteliais perdem suas características em detrimento de características mesenquimais. A EMT é essencial para a oncogênese, levando ao desenvolvimento de tumores agressivos, como invasividade e capacidade de metástase. Nesse contexto as metaloproteinases de matriz (MMPs) são responsáveis pela degradação da matriz extracelular (MEC) por meio da quebra de diversas proteínas em sua estrutura. As MMPs promovem proliferação e migração celular, e podem desempenhar um papel na apoptose celular,

angiogênese, regeneração tecidual e resposta imune, como em alguns tipos de cânceres (Scheau et. al.. 2019).

A progressão do tumor é comumente acompanhada pelo crescimento de vasos sanguíneos, devido à necessidade das células malignas em acessar o sistema circulatório para prosperarem. Os tumores podem ser vascularizados através do agregamento da vasculatura pré-existente ou pela indução da formação de novos vasos sanguíneos através de diversos mecanismos moleculares e celulares, como: Angiogênese germinativa, angiogênese intussusceptiva, vasculogênese, recrutamento de células progenitoras endoteliais, mimetismo vascular e transdiferenciação de células-tronco cancerosas (CSC) (Lugano et. al., 2020).

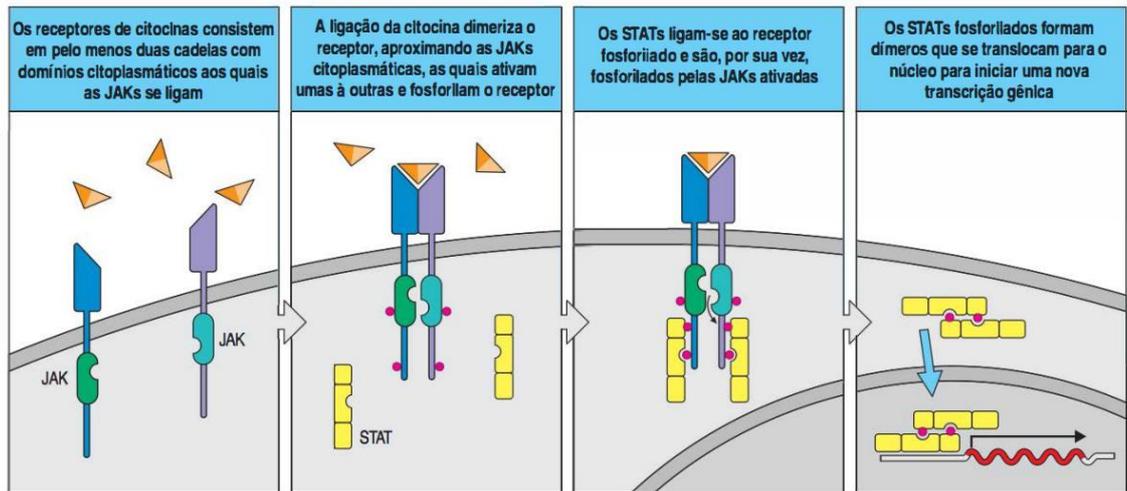
2.3.3 Marcadores moleculares para estudo do Microambiente Tumoral

Os marcadores moleculares são assinaturas genéticas que auxiliam a descobrir alterações em sequências gênicas, níveis de expressão ou estruturas e até mesmo funções proteicas alteradas. Estudos envolvendo marcadores, fornecem dados abrangentes a respeito do câncer, o que auxilia na caracterização molecular do microambiente tumoral (Nair et. al., 2018).

Os transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs) atuam como fatores de transcrição através da via JAK/STAT onde se ligam e ativam a transcrição de vários genes importantes para a imunidade adaptativa (Figura 8). Diversas citocinas e fatores de crescimento associados ativação de STATs induzem eventos variados como hematopoiese, resposta imunológica, inflamação, reparação tecidual, adipogênese e apoptose. De fato, a maioria das respostas imunes iniciadas por citocinas são dependentes de STATs. Alterações na sinalização em STATs que resultam em superativação ou regulação negativa foram implicadas no surgimento e progressão de diversos cânceres (Gunduz et al., 2011). A via de sinalização JAK/STAT de forma geral, demonstrou desempenhar um papel importante na tumorigênese e metástase. Particularmente, a forma constitutivamente ativa de STAT3 foi detectada no câncer de mama, indicando seu importante papel na tumorigênese do câncer de mama. A ativação da sinalização JAK/STAT contribui

para vários mecanismos biológicos associados ao câncer, como: proliferação celular, angiogênese, anti-apoptose, metástase e escape imunológico (Shao et. al., 2021).

Figura 8. Representação de receptores de citocinas sinalizando através da via JAK-STAT.



Fonte: Janeway (2014).

As STATs apresentam papéis controversos, sendo amplamente exploradas no contexto do câncer. Vários membros da família STAT, que abrange STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B e STAT6 como um todo, podem ser associados ao câncer com papéis distintos. Como STAT3 e STAT5 que são associados à iniciação e progressão do tumor. Por outro lado, STAT1 e STAT2 são essenciais na defesa antitumoral e na manutenção de uma resposta imune efetiva e de longo prazo (Gunduz et al., 2011).

A alteração da expressão de STAT3 e STAT5 no TME está principalmente associada à progressão e disseminação de tumores. Aumentos em STAT5 nuclear têm sido associados à recorrência precoce e resultados negativos de sobrevida no câncer de próstata. A superativação de STAT3 está associada à diminuição da sobrevida e alto risco de recorrência em carcinoma de células renais, glioblastoma, câncer cervical, câncer colorretal e melanoma (Furth et. al., 2014).

O aumento da expressão de STAT3 foi demonstrado em vários modelos murinos de câncer de mama, bem como em tecidos de pacientes, e tem sido associado à evasão imune durante a tumorigênese e a metástase. Em células de câncer de mama CD44⁺ CD24⁻ basais (indicativas de um fenótipo semelhante a células-tronco) a superativação de STAT3 correlacionou-se com baixa sobrevida livre de metástase e a indução de quimiocinas pró-invasivas, sinalização de IL-6 e TGF- β . No entanto, embora os efeitos oncogênicos de STAT3 tenham sido bem estabelecidos, STAT3 ativado se correlaciona com a melhora da sobrevida em alguns subtipos de câncer (Furth et. al., 2014).

O aumento da ativação de STAT3 está associado à progressão do tumor, geralmente é a perda de STAT1 e os componentes da via associada que foram mais amplamente explorados no contexto do câncer e da imunidade. Em modelos de melanoma e câncer de pulmão, a fosforilação prejudicada de STAT1 em resposta ao IFN- γ resultou em baixa indutibilidade do MHC e sensibilidade reduzida do IFN- γ devido à transdução defeituosa do sinal JAK em modelos de melanoma humano e carcinoma de pulmão (Owen et. al., 2019).

Os fatores de transcrição *forkhead* de mamíferos da classe O (FOXOs) apresentam quatro membros: FOXO1, FOXO3, FOXO4 e FOXO6. FOXO1 e FOXO3 são expressos em quase todos os tecidos. O FOXO4 é altamente expresso no tecido muscular. A atividade transcricional do FOXO é regulada por um complexo conjunto de modificações pós-traducionais. Essas modificações podem ser ativadoras ou inativadoras (Wang, 2014). A expressão de FOXO4 é reprimida por microRNAs pós-transcricionais em múltiplas células cancerosas, enquanto a função de FOXO4 é regulada por modificações pós-traducionais e interação com outras proteínas. A desregulação do FOXO4 está intimamente ligada à progressão de vários tipos de câncer, senescência e outras doenças (Liu et. al., 2020).

Estudos histopatológicos que correlacionaram a expressão de FOXO em pacientes com câncer renderam resultados contraditórios. Diversos estudos observaram uma correlação entre alta expressão de FOXO associado a um bom prognóstico. Por outro lado, vários estudos indicaram que altos níveis de FOXO se correlacionam com mau prognóstico (Hornsveld et. al., 2018).

FOXO4 funciona como um supressor de tumor no desenvolvimento e progressão do câncer. A expressão de FOXO4 é significativamente diminuída ou deletada no tecido do câncer colorretal. A forte expressão de HER2, um oncogene receptor de tirosina quinase em cânceres, tem sido associada a um mau prognóstico. O FOXO4 constitutivamente ativo pode reduzir o início, o tamanho e a progressão do tumor em camundongos transplantados com células de câncer de mama Her2-positivas (Wang et. al., 2014).

Diante disso, estudos destes marcadores, dentro do contexto do microambiente tumoral do câncer de mama, trazem perspectivas acerca de possíveis ferramentas de diagnóstico e informações sobre possíveis prognósticos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa avaliar a relação da presença do HPV em tumores mamários e sua influência sob precursores de vias imunológicas, e na ativação de respostas imunes celulares em modelo *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de expressão dos genes JAK2, STAT3, STAT4, STAT6, FOXO4, em tumores de mama com e sem a presença do HPV;
- Analisar as características clínicas e sócio-demográficas dos tumores das pacientes com câncer de mama;
- Realizar co-cultivo das células tumorais MDA-MB-231 com linfócitos e monócitos;
- Transfectar as células tumorais com as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV-16;
- Avaliar, *in vitro*, a resposta imune celular de células tumorais da linhagem MDA-MB-231 (expressando as oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV-16) co-cultivadas com linfócitos e monócitos.

4. METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado em dois contextos, os quais podem ser divididos em:

Parte 1: Avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição JAK2, STAT3, STAT4, STAT6 e FOXO4, em amostras de tumores das pacientes.

Parte 2: Ensaios *in vitro* a partir do co-cultivo de células da linhagem tumoral MDA-MB-231 (transfectadas com oncoproteínas do HPV) com linfócitos e monócitos, a fim de avaliar o perfil de resposta induzida.

Parte 1:

4.1.1 Amostras Biológicas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, sob o número CAAE: 28508614.9.0000.5208. As amostras biológicas foram derivadas de tecido fresco de quatorze mulheres com diagnóstico histológico de câncer de mama (idade média de 43,63 anos, variação 20-69). As amostras foram coletadas entre o período de junho de 2012 a dezembro de 2015, a partir de pacientes tratadas no Hospital Barão de Lucena (HBL), Recife, Pernambuco. A classificação histológica do tecido mamário utilizada no presente estudo está em consonância com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS). As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas e genotipadas em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa.

4.1.2 Detecção do DNA viral

A detecção do DNA viral foi realizada por um trabalho anterior, do nosso grupo (Lima et. al., 2016). Foi realizada com o conjunto de primers degenerados MY09 e MY11, amplificando um fragmento de aproximadamente 450 pb na região altamente conservada do gene L1. Posteriormente, foram realizadas Nested-PCRs, utilizando os oligonucleotídeos GP5 e GP6, gerando um fragmento de 140pb aproximadamente. Esse sistema de iniciadores detecta mais de 23 tipos de HPVs.

Para genotipagem, as amostras positivas para o DNA do HPV foram tipificadas por sequenciamento a partir dos oligonucleotídeos GP5/6

4.1.3 Extração de RNA

Foi extraído o RNA de todas as amostras frescas coletadas no Hospital Barão de Lucena. As extrações de RNA foram realizadas utilizando TRIzol, com objetivo de isolar o RNA, seguida pela utilização do *RNeasy Mini kit* (Qiagen) para isolar e purificar o RNA da amostra, conforme orientações do fabricante.

4.1.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o manual do kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase* (Thermo Scientific), após a verificação da quantidade e qualidade do RNA isolado através da visualização das bandas de RNA ribossômico em eletroforese em gel de agarose e do uso do Nanodrop (Thermo Scientific), para quantificação, considerando as razões 260/280.

4.1.5 PCR quantitativa em tempo real

A amplificação dos genes alvo foi realizada no termociclador *AriaMx Real-time PCR System* (Agilent) com primers específicos (Tabela 1), juntamente com os genes de referência ACTB e GAPDH com intuito de calcular a expressão relativa dos genes alvos, através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, de acordo com Livak e Schmittgen, (2001).

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos e temperatura de anelamento (T.a.).

Alvos	Sequências	T.a.
ACTB F	AAGAGAGGCATCCTCACCCCT	60°C
ACTB R	TACATGGCTGGGGTGTGAA	60°C
GAPDH F	GAAGGTGGGGCTCATTG	60°C
GAPDH R	TTAAAAGCAGCCCTGGTG	60°C
STAT4 F	CCTGGGTGGACCAATCTGAA	60°C
STAT4 R	CTCGCAGGATGTCAGCGAA	60°C
JAK2 F	TCTGGGGAGTATGTTGCAGAA	60°C
JAK2 R	AGACATGGTTGGGTGGATAACC	60°C
STAT6 F	CAAAGCCCTAGTGCTGAAGAG	60°C
STAT6 R	CTCCTGCTGTAGCTGGGAATA	60°C
STAT3 F	GGAGGAGGCATTCGGAAAG	60°C
STAT3 R	TCGTTGGTGTCACACACAGAT	60°C
FOXO F	CTTTCTGAAGACTGGCAGGAATGT	60°C
FOXO R	GATCTAGGTCTATGATCGCGGCAG	60°C

4.1.6 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.0.0). O teste de Contingência e teste exato de Fisher foram realizados para estimar o valor de p e a razão. A distribuição dos dados foi testada utilizando teste de Kolmogorov-Smirnov, teste de Mean-Whitney e teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação de Dunn aplicado para comparar os níveis de expressão dos oncogenes, a expressão dos fatores de transcrição e a presença da infecção pelo

HPV. O teste de Correlação de Spearman foi realizado para avaliar a correlação entre a expressão gênica. Quanto ao valor de p , foram considerados estatisticamente significativos valores de p menores que $p < 0,05$.

Parte 2

4.2.1 Linhagem celular

A linhagem celular MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) é uma linhagem epitelial de câncer de mama humano, derivada da metástase de um adenocarcinoma mamário, triplo negativo. MDA-MB-231 possui o seguinte fenótipo: CD44+CD24-/baixo. As células foram cultivadas a 37°C (5% CO₂) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-Invitrogen®) mais 10% de soro fetal bovino (Gibco®); 10 ml de uma solução de antibiótico penicilina/estreptomicina (pen/strep) 10x; 1% de L-Glutamina (Sigma®) - DMEM completo - e passou pelo processo de priming até atingir 70-80% de confluência.

4.2.2 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Cerca de 8-10 mL de sangue periférico foram coletados em tubo de EDTA de 5 doadores voluntários saudáveis entre 24 e 45 anos, 2 homens e 3 mulheres, que não apresentavam infecção recente (um mês antes da coleta de sangue), síndromes respiratórias, comprometimento hepático ou gastrointestinal, síndromes metabólicas ou câncer. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas do sangue usando uma solução Ficoll 1,077 g/mL (300 xg / 30min / 26°C) (GE Healthcare®). Após duas lavagens com 1X PBS, as células foram ressuspensas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-Invitrogen®) com adição de 10% de soro fetal bovino (Gibco®), 1% de L-Glutamina (Sigma®) e antibióticos. As células obtidas de cada voluntário foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm₂ (24 horas/5% CO₂/37°C). No dia seguinte, os linfócitos suspensos foram centrifugados em PBS 1X (200 x g/10 min) e contados utilizando o contador de células Countess 3 (Thermo Fisher®). Do mesmo frasco de cultura, os monócitos aderidos foram removidos com auxílio de tripsina a 2%, seguido de centrifugação com 1X PBS (200 x g/10 min) e contagem (Condessa 3/Thermo Fisher®). Linfócitos e macrófagos

foram plaqueados (placas de 48 poços/105 células/poço) em diferentes esquemas de cultura celular.

4.2.3 Produção e transfecção de oncoproteínas de HPV

As sequências oncogênicas de tipo selvagem E5, E6 e E7 (sequência genética de referência inalterada) de HPV-16, baseadas na sequência depositada no GenBank (K02718.1), foram clonadas no vetor de expressão para células de mamíferos, pCDNA 3.1 (+) (Invitogen®). Os clones foram confirmados por análise de restrição e sequenciados utilizando o kit de sequenciamento de ciclo ABI PRISM BigDye™ Terminator v3.1 ReadyReaction (Applied Biosystems®) no sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®). Após a confirmação da clonagem, o DNA dos vetores recombinantes foi isolado pelo kit Plus Maxi (Qiagen) conforme instruções do fabricante.

4.2.4 Transfecção de oncoproteínas do HPV

Em placas de cultura de células de 48 poços, cerca de 10^5 células tumorais (MDA-MB-231) em cada poço foram semeadas em 1 mL de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-Invitogen®) mais 10% de soro bovino fetal (Gibco®); 1% L-Glutamina (Sigma®) - DMEM completo. Estas células tumorais foram transfectadas com 250 ng/ul de vetor pcDNA 3.1 (+) vazio, pcDNA-E5, pcDNA-E6 ou pcDNA-E7 separadamente usando o reagente de transfecção Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As células foram incubadas a 37°C em incubadora com 5% de CO₂ por 24h.

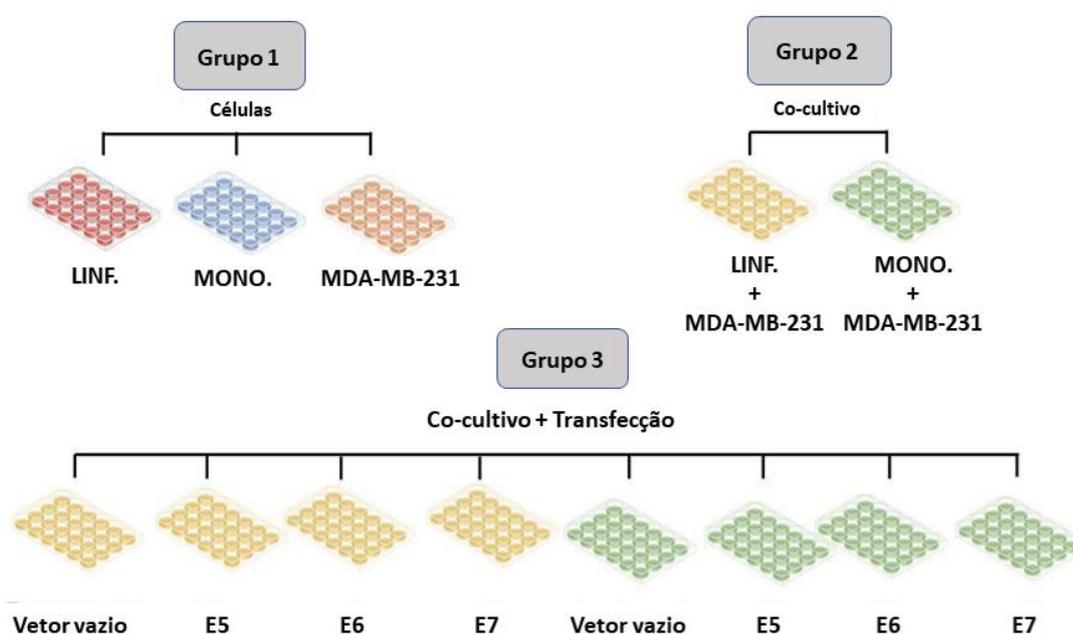
Posteriormente, o RNA foi extraído das células usando o PureLink™ RNA Mini Kit (Invitogen®) e usado para confirmar a eficiência da transfecção de E5, E6 e E7 por RT-qPCR. Todas as reações foram realizadas em termociclador LineGene9660 (Bioer), utilizando SYBR green com GoTaq qPCR Master Mix (Promega) como sistema de detecção e primers específicos para E5 (*Forwad*: ACT GGC GTG CTT TTT GCT TTG e *Reverse*: GAC ACA GAC AAA AGC AGC GG), E6 (*Forwad*: GAG AAA CTG CAA TGT TTC AGG ACC e *Reverse*: TGT ATA GTT GTT TGC AGC TCT GTG C) e E7 (*Forwad*: AGC TCA GAG GAG GAG GAT GA e *Reverse*: GAG AAC AGA TGG GGC ACA CA).

Para calcular a expressão relativa dos genes alvo, eles foram analisados em conjunto com os genes de referência ACTB (*Forward*: AAGAGAGGCATCCTCACCT e *Reverse*: TACATGGCTGGGGTGTTGAA) e GAPDH (*Forward*: GAAGGTGGGGCTCATTTG e *Reverse*: TTAAAAGCAGCCCTGGTG). O $2^{\Delta\Delta Cq}$ foi calculado para analisar a expressão de cada oncogene em comparação com os genes endógenos (ACTB e GAPDH), bem como foi comparado com a expressão dos oncogenes na linhagem celular C3 (célula positiva para HPV-16) (Livak et. al., 2001). Os valores de Cq superiores a 35 ou aqueles que não apresentaram valor de amplificação foram excluídos das etapas seguintes da análise.

4.2.5 Estimulação *in vitro* de PBMC

Quando as células transfectadas (conforme descrito na seção anterior) atingiram 80% de confluência, linfócitos ou monócitos foram inseridos nas culturas para investigar o estímulo imunológico. Os linfócitos e monócitos obtidos, conforme descrito anteriormente (item 4.2.2), foram cultivados separadamente em placas de 48 poços, previamente semeadas com células tumorais utilizando os esquemas de cultura celular descritos na figura 9. As células cultivadas foram mantidas por 24 horas sob o estímulo das células tumorais e após esse período as células imunes foram coletadas e marcadas para imunofenotipagem, e o sobrenadante das culturas foi armazenado para investigação de citocinas.

Figura 9. Grupo 1 linfócitos (LINF.), monócitos (MONO), células MDA-MB-231; Grupo 2 células MDA-MB-231 co-cultivadas com linfócitos (LINF.+MDA), células MDA-MB-231 co-cultivadas com monócitos (MONO+MDA); Grupo 3 LINF.+MDA cultivado com vetor vazio, LINF.+MDA transfectado com o oncogene E5, LINF.+MDA transfectado com o oncogene E6, LINF.+MDA transfectado com o oncogene E7, MONO+MDA cultivado com vetor vazio, MONO+MDA transfectado com o oncogene E5, MONO+MDA transfectado com o oncogene E6, MONO+MDA transfectado com o oncogene E7.



Fonte: A autora (2023).

4.2.6 Imunofenotipagem de PBMCs estimuladas *in vitro* com células tumorais e investigação das citocinas produzidas no sobrenadante da cultura

O ensaio de imunofenotipagem foi realizado para investigar a resposta imune induzida por células tumorais em PBMC, através de anticorpos contra os receptores de superfície anti-CD3 (FITC ou APC), -CD4 (FITC ou APC), -CD8 (FITC ou PE), -CD56 (PEcy5.5 ou APC), -CD25 (PercP), -CD14 (FITC), -B7.1 (PE), -B7.2 (APC), -HLA-DR (PercP). Anticorpos intracelulares anti-FoxP3 (PE), -perforina (FITC), granzima (PercP), -IL-17 (PE), -IFN (APC), -IL-10 (PE) também foram utilizados.

Para identificação específica da linhagem MDA-MB 231 foi utilizado o anticorpo anti-CD44 (todos os anticorpos eram da BD ®). As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- α e IL-17 foram investigadas utilizando o kit CBA (BD ®) a partir do sobrenadante da cultura (Tabela 2).

Tabela 2. Marcadores utilizados para imunofenotipagem.

Perfil linfócito	Perfil linfócito T Regulatório	Perfil CD8 + Ativ. citotóxica	Perfil CD56 + Ativ. citotóxica	Ativação Monócito
Anti-CD3	Anti-CD3	Anti-CD8	Anti-CD56	Anti-CD14
Anti-CD4	Anti-CD25	Anti-perforina	Anti-perforina	Anti-HLA-DR
Anti-CD8	Anti-FoxP3	Anti-granzima	Anti-granzima	Anti-B7.1 (Anti-CD80)
Anti-CD56	Anti-CD4			Anti-B7.2 (Anti-CD86)

Todos os anticorpos foram provenientes da BD Bioscience®. Todas as aquisições foram realizadas por citometria de fluxo (Accuri BD ®), sendo 30.000 eventos na região P1 (*gates* de linfócitos ou monócitos) para investigação celular e 2.100 eventos para investigação humoral através da produção de citocinas nos grupos experimentais. As análises foram realizadas utilizando a plataforma de citometria Accuri.

4.2.7 Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todas as amostras que adotaram distribuição normal foram utilizadas para esse fim e para isso foi realizado o teste Ordinary One-way ANOVA. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 PERFIL DAS PACIENTES

Para compreender o perfil sociodemográfico das amostras tumorais provenientes das pacientes e assim correlacioná-las a estudos equivalentes, foi realizado um cálculo de frequência em relação ao número total de pacientes e diferentes aspectos, como: idade, tabagismo, amamentação, menarca, menopausa, nuliparidade e detecção do HPV. Ao avaliar o perfil das pacientes (tabela 3), foi observado que as mesmas estavam com faixas etárias bastante mistas, variando de 20 a 69 anos (idade média de 43,63 anos). Em relação ao tabagismo, 36% das pacientes o praticavam. Enquanto amamentação (no momento do estudo ou/e anteriormente), 57% sim e 43% não. A maior parte das pacientes (64%) afirmaram que a menarca foi antes dos 15 anos de idade, menopausa 57% e 86% já tiveram filhos. Em relação a detecção do HPV, 64% (9) foram positivas para HPV-16 e 36% (5) negativas.

Tabela 3 - Relação entre a presença do HPV e a estimativa do *odds ratio* de acordo com as seguintes características: idade, tabagismo, amamentação, menarca, menopausa e nuliparidade e detecção do HPV.

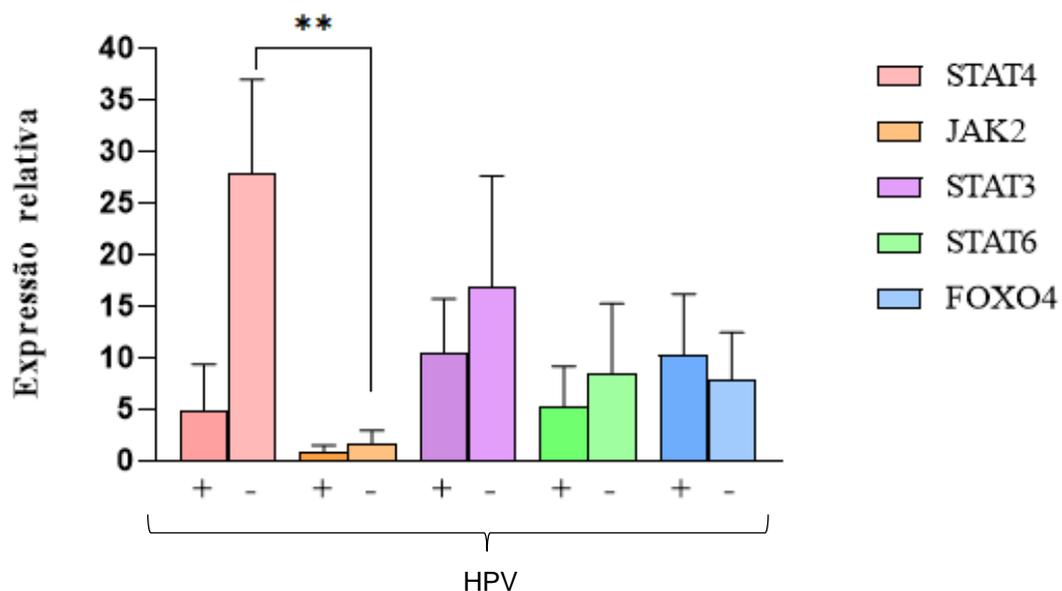
Características	HPV + (%)	HPV - (%)	Total	Odds Ratio (IC 95%)	p valor
Idade				0,5333 (0,07092 - 3,899)	>0,9999
20 a 50	4 (28,57)	3 (21,43)	7		
51 a 69	5 (35,71)	2 (14,29)	7		
Total	9	5	14		
Tabagismo				Infinito (0,7731 - Infinity)	0,0859
Sim	5 (35,71)	0 (0,00)	5		
Não	4 (28,57)	5 (35,71)	9		
Total	9	5	14		
Amamentação				14,00 (0,8265 - 189,4)	0,0909
Sim	7 (50,00)	1 (7,14)	8		
Não	2 (14,29)	4 (28,57)	6		
Total	9	5	14		
Menarca				0,3125 (0,02097 - 3,462)	0,5804
< 15	5 (35,71)	4 (28,57)	9		
≥ 15	4 (28,57)	1 (7,14)	5		
Total	9	5	14		
Menopausa				3,00 (0,3871 - 22,57)	0,5804
Sim	6 (42,86)	2 (14,29)	8		
Não	3 (21,43)	3 (21,43)	6		
Total	9	5			
Nuliparidade				0,000 (0,000 to 1,075)	0,1099
Sim	0 (0,00)	2 (14,29)	2		
Não	9 (64,29)	3 (21,43)	12		
Total	9	5			

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

As amostras, provenientes de tumores frescos de mama, foram avaliadas quanto ao perfil de expressão dos fatores de transcrição STAT3, STAT4, STAT6, JAK2 e FOXO4. Os tumores foram divididos em HPV negativos (35,7% HPV-) e HPV

positivos (64,3% HPV+) quando as amostras apresentaram expressão para uma das oncoproteínas do HPV. As amostras HPV positivas apresentaram uma tendência para uma menor expressão dos genes STAT4, JAK2, STAT3 e STAT6. Entretanto, FOXO4, apresentou resultado oposto, sendo menos expresso em amostras HPV negativas e mais expresso nas amostras positivas. Apenas houve diferença significativa entre STAT4 e JAK2, considerando $p < 0,05$ (Figura 10).

Figura 10. Expressão de fatores de transcrição (STAT4, JAK2, STAT3, STAT6 e FOXO4) em amostras de tumores de mama HPV negativos e HPV positivos. Gráfico de classificações de Teste de Mann-Whitney com mediana e IC 95%. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Barras de erro: erro padrão entre amostras.



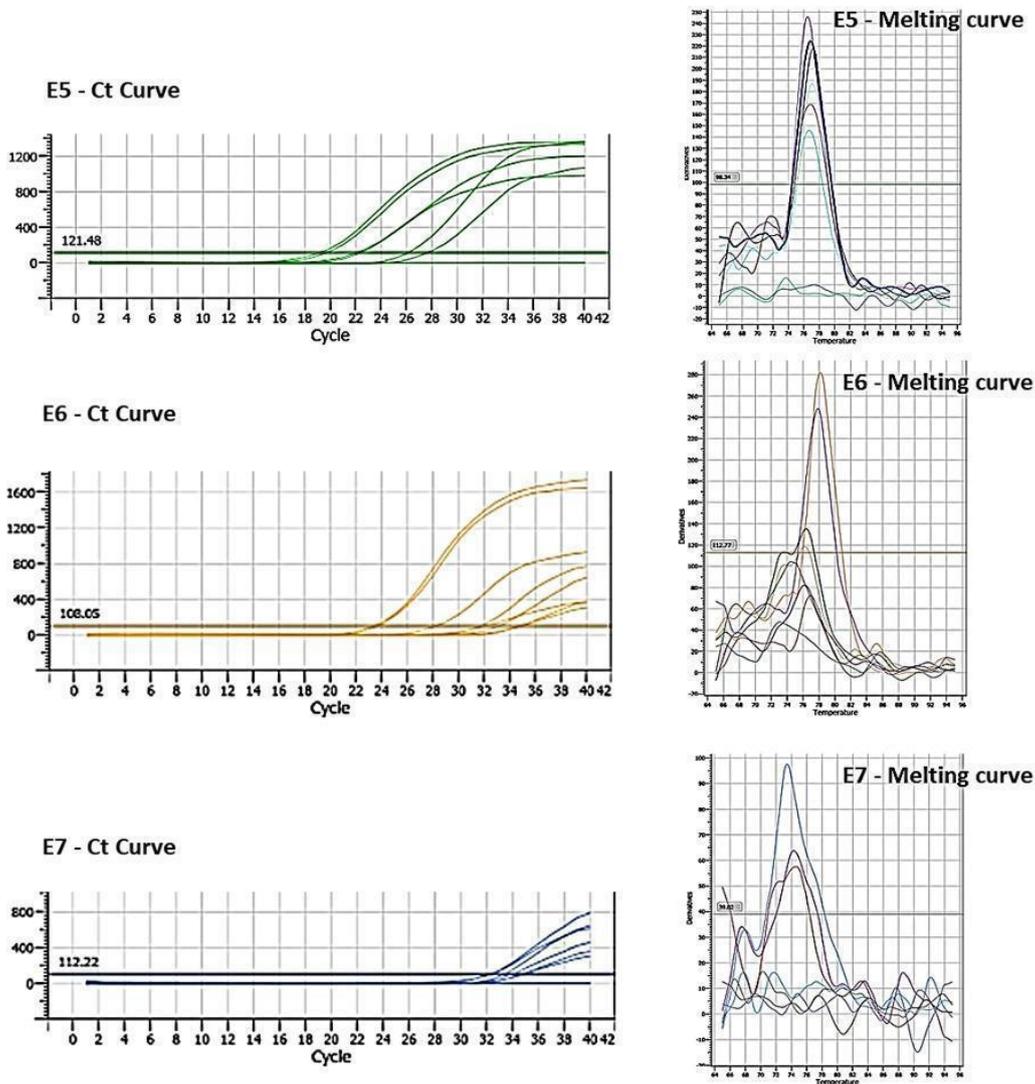
5.3 ENSAIOS *IN VITRO*

5.3.1 Confirmação da transfecção a partir da expressão dos oncogenes

Para confirmar a expressão dos oncogenes virais após a transfecção, foi realizado um ensaio RTqPCR utilizando primers específicos para os oncogenes E5, E6 e E7. A expressão dos três oncogenes transfectados foi detectada nas células

transfectadas, principalmente em células contendo E5 de HPV-16, que se mostrou altamente expressa (figura 11).

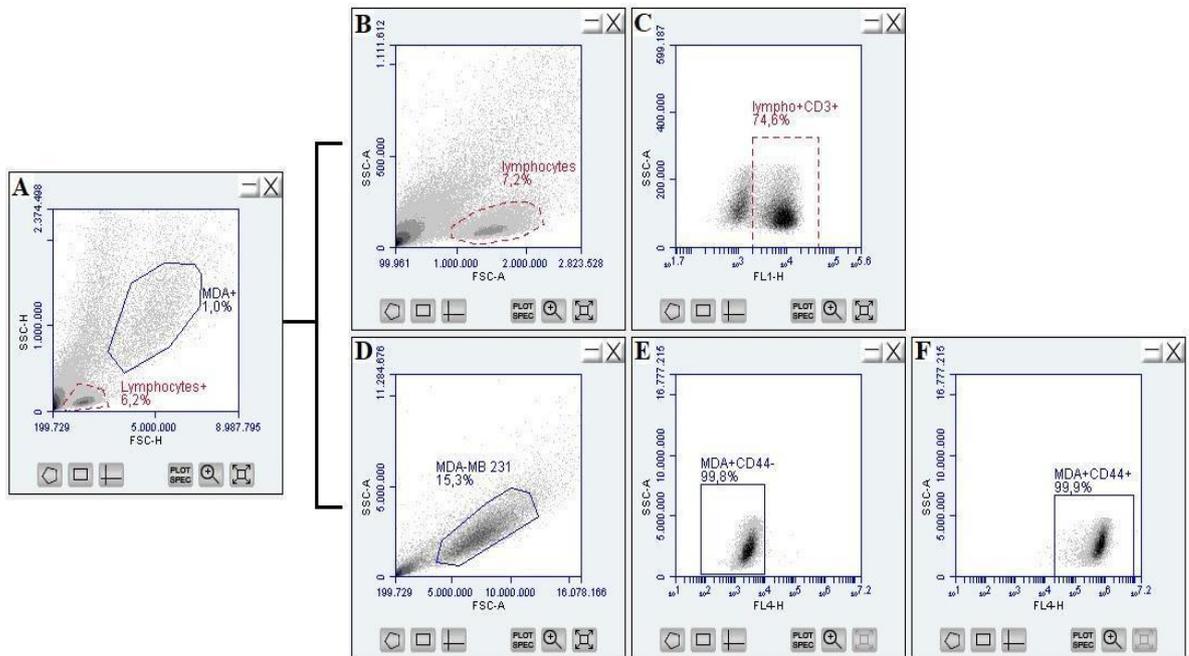
Figura 11. Curva Cq e Melting referente à expressão dos oncogenes E5, E6 e E7 utilizados para transfectar células MDA-MB-231.



5.3.2 Estratégia de *gate*

Para caracterização das células MDA-MB-231, foi realizada a fenotipagem e estratégia de *gate* de linfócitos e da linhagem tumoral, e separá-la dos linfócitos, permitindo traçar o perfil de ativação das células imunológicas (figura 12).

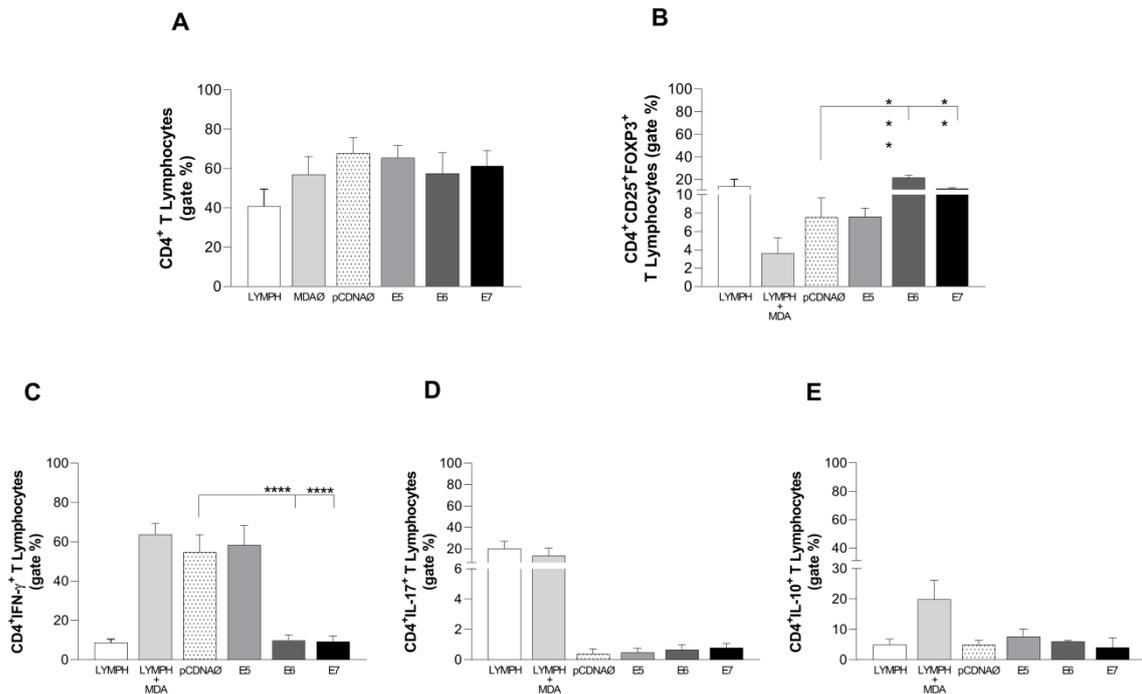
Figura 12. Estratégias de *gate* de linfócitos e células MDA-MB-231. A – *Gate* inicial. B – isolamento de linfócitos. C – Isolamento de linfócitos T (células CD3+). D – Isolamento de células MDA-MB-231. E e F – demonstração de células MDA-MB-231+CD44 negativas e positivas, respectivamente.



5.3.3 Perfil de estimulação de linfócitos T CD4+

Para investigação do perfil de estimulação imunológica em linfócitos e monócitos, células tumorais de mama foram transfectadas com os oncogenes E5, E6 e E7 e expostas a células imunes por 24 horas. Houve aumento no número de linfócitos T CD4+ após coestimulação com células MDA-MB-231. Resultados interessantes para linfócitos reguladores (Treg) podem ser vistos na figura 13 (4-B), quando células transfectadas, especialmente E6 e E7, apresentaram aumento do perfil supressor de linfócitos CD4 (CD4+CD25+FOXP3+). Reforçando o perfil regulatório, as citocinas intracelulares avaliadas nos linfócitos CD4+, como IFN- γ , IL-17 e IL-10, (mas apenas para IFN- γ houve diferença significativa) apresentaram produção prejudicada, pelos oncogenes do HPV (exceto E5) nas células transfectadas (figura 13-C, D e E).

Figura 13. Perfil de estimulação de linfócitos T CD4+ cultivados com linhagem tumoral MDA-MB 231. Os grupos experimentais foram compostos apenas por linfócitos (LYMPH), linfócitos cultivados com MDA-MB 231 (MDA Ø), vetor pcDNA vazio e linfócitos cultivados com MDA-MB 231 transfectados com os genes E5, E6 e E7. (A) – Contagem diferencial de linfócitos T CD4+. - Contagem diferencial (B) do subconjunto CD25+ de linfócitos T CD4+ e seu perfil de expressão supressora pela presença da molécula intracelular FOXP3+. (C), (D) e (E) presença de citocinas intracelulares IFN- γ , IL-17 e IL-10 em linfócitos CD4+, respectivamente. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. Barras de erro: erro padrão entre amostras.

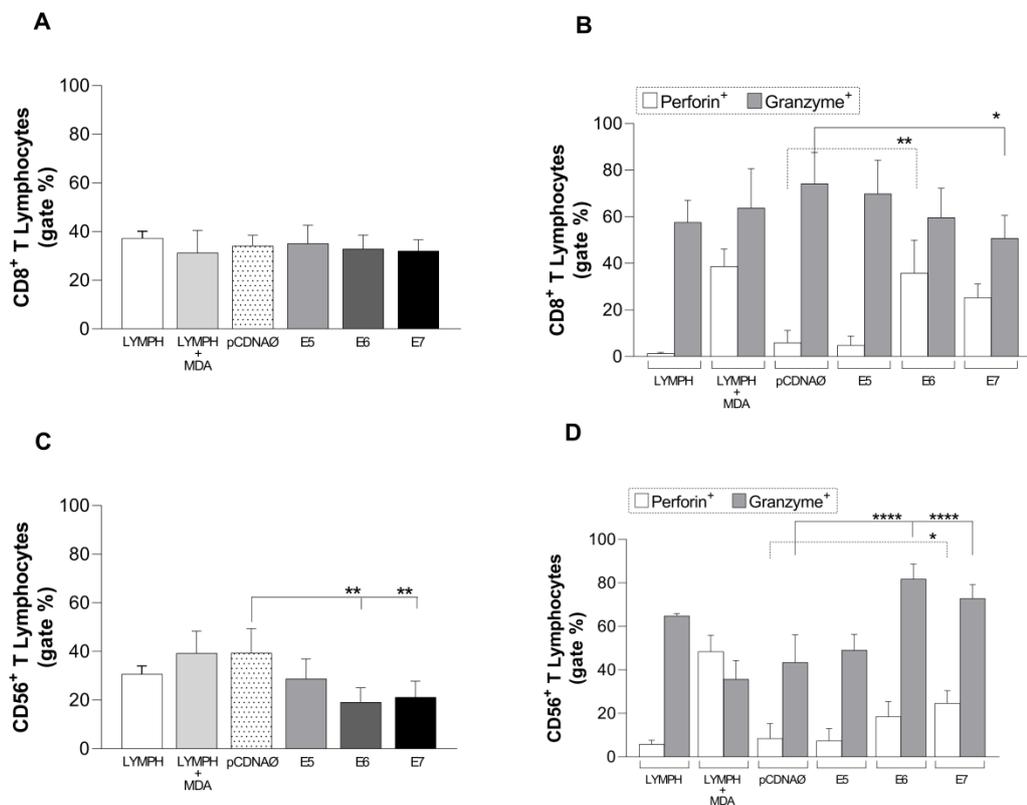


5.3.4 Estimulação citotóxica de linfócitos T CD8+

Através da investigação da ação citotóxica dos linfócitos T CD8+ contra células tumorais, foi observado que não ocorreu alteração na contagem dos linfócitos (Figura 14-A). Houve aumento de perforina nas células transfectadas com E6 e E7, com resultados estatisticamente significativos quando houve expressão de E6 (Figura 14-B) e diminuição de granzima nas células de mama transfectadas com E6 e E7, com valores estatísticos significativos, ao comparar com o vetor vazio, para as células que apresentavam E7 (Figura 14-B). Resultados diferentes foram encontrados para linfócitos T Natural Killer (CD56+). Houve declínio desses linfócitos, principalmente em relação aos genes E6 e E7 (Figura 14-C) seguido de

diminuição da capacidade de resposta citotóxica devido à baixa produção de perforina e acúmulo intracelular de granzimas (Figura 14-D).

Figura 14. Perfil de estimulação de linfócitos T CD8+ cultivados com a linhagem tumoral MDA-MB 231. Os grupos experimentais foram compostos apenas por linfócitos (LYMPH), linfócitos cultivados com MDA-MB 231 (MDA Ø), vetor pcDNA vazio e linfócitos cultivados com MDA-MB 231 transfectado com os genes E5, E6 e E7. (A) – Contagem diferencial de linfócitos T CD8+. (B) – produção intracelular de perforina e granzima em linfócitos T CD8+. (C) - Contagem diferencial de linfócitos T CD56+. (D) – produção intracelular de perforina e granzima em linfócitos T CD56+. Os asteriscos representam significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Barras de erro: erro padrão entre amostras.

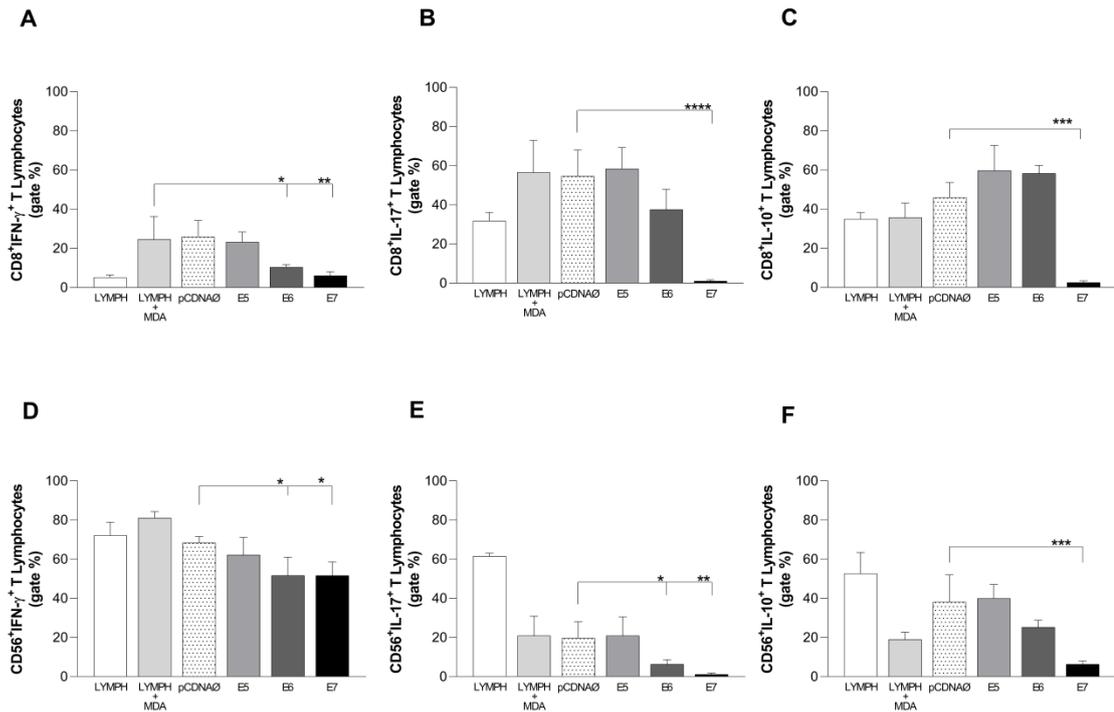


5.3.5 Perfil de citocinas intracelulares de linfócitos T CD8+ e CD56+

Semelhante aos linfócitos T CD4+, a produção intracelular de citocinas a partir de células citotóxicas foi investigada. As células transfectadas com oncogenes E6 e E7 promoveram diminuição de IFN- γ nos subtipos de linfócitos CD8 + e CD56 + (Figura 15-A e D). O mesmo ocorreu para IL-17 (Figura 15-B e E) e IL-10 (Figura 15-

C e F). Em particular, nas células co-cultivadas com E7, sofreram decréscimo significativo na produção das citocinas (Figura 15-A,B,C,E e F), exceto IFN- γ .

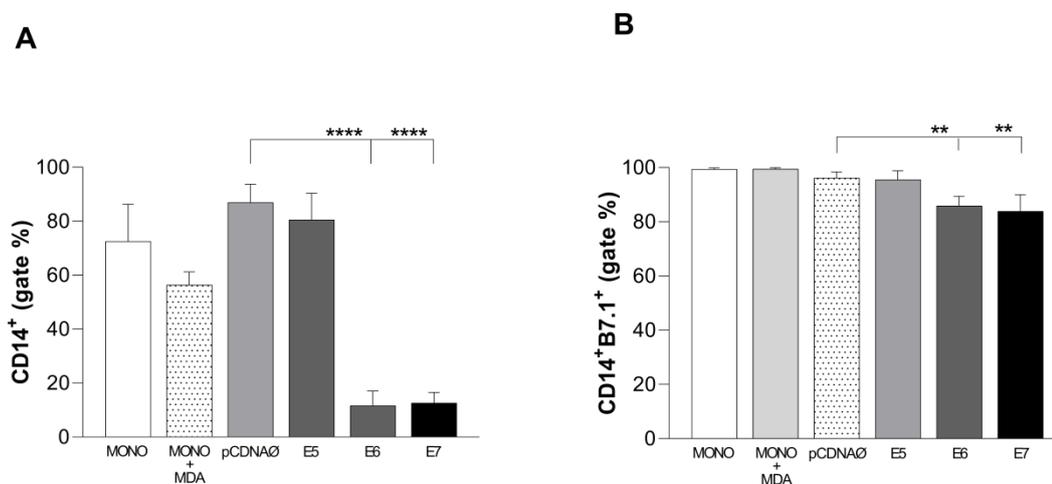
Figura 15. Citocinas intracelulares produzidas por linfócitos CD8+ e CD56+ contra células tumorais. (A), (B) e (C) – linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ , IL-17 e IL-10, respectivamente; (D), (E) e (F) – linfócitos T CD56+ produtores de IFN- γ , IL-17 e IL-10, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Barras de erro: erro padrão entre amostras.



5.3.6 Perfil de estimulação de monócitos CD14+

O perfil de resposta imune induzido por monócitos contra células tumorais mostrou uma supressão dos monócitos, promovida pelos oncogenes E6 e E7 (Figura 16-A), seguida de declínio na resposta coestimulatória da molécula B7.1 (Figura 16-B). Não houve alterações nas moléculas coestimuladoras B7.2 e HLA-DR.

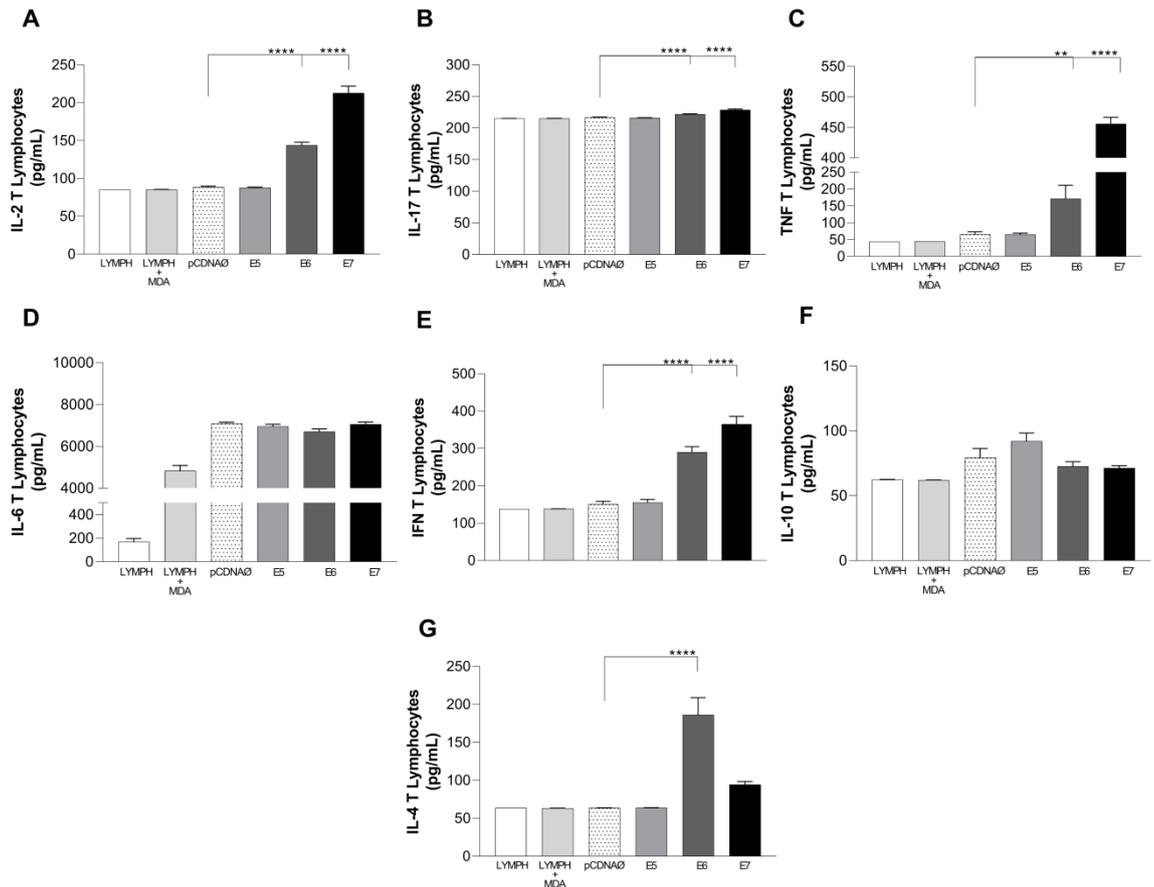
Figura 16. Perfil de estimulação de monócitos CD14+ cultivados com linhagem de células tumorais MDA-MB-231. Grupos experimentais: apenas monócitos (MONO), monócitos cultivados com MDA-MB-231 (MONO+MDA) e monócitos cultivados com oncogenes E5, E6 e E7 e com o vetor vazio, MDA-MB-231 transfectado. (A) – Contagem diferencial de monócitos CD14+. (B) – Produção de moléculas coestimuladoras de superfície B7.1. *p < 0,05, ****p<0,0001. Barras de erro: erro padrão entre amostras.



5.3.7 Citocinas liberadas nos sobrenadantes dos grupos experimentais

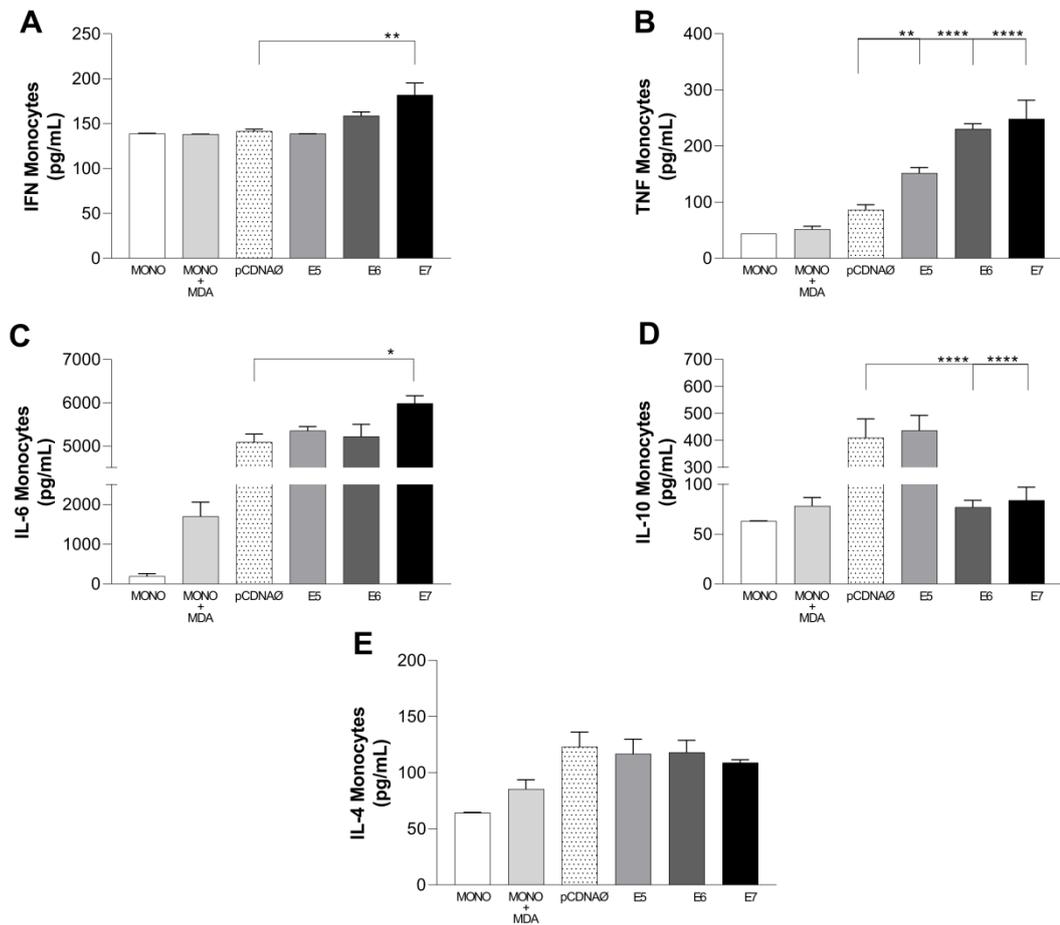
As citocinas liberadas nos sobrenadantes das culturas de linfócitos e monócitos foram investigadas. Os resultados das culturas de linfócitos e MDA-MB-231 demonstraram que as células transfectadas, especialmente com os oncogenes E6 e E7 do HPV, promoveram alta liberação de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-4 (Figura 17-A, B,C e G). A IL-10 só foi aumentada diferencialmente em E5 (Figura 17-F). Além disso, a citocina IL-6 foi altamente estimulada em todos os grupos experimentais (Figura 17-D).

Figura 17. Citocinas produzidas nos sobrenadantes de culturas de linfócitos e células tumorais. (A) – (G) – citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-10 e IL-4, respectivamente. Os asteriscos representam significância estatística * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$. Barras de erro: erro padrão entre amostras.



Os resultados das co-culturas de monócitos e MDA-MB-231 transfectadas, mostraram alta produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-4 (Figura 18-A, B, C e E). IL-10 foi inibido pelas oncoproteínas E6 e E7, com valores estatisticamente significantes quando comparados ao vetor vazio (Figura 18-F). E IL-6 e TNF- α , foram mais produzidos na presença das oncoproteínas, principalmente quando houve expressão de E7 (Figura 18-C e D). Em IL-2 e IFN- γ ocorreu aumento estatisticamente significativo de produção, na presença de E6 e E7 (Figura 18-A e E). Não foi observada alteração no perfil da citocina IL-17.

Figura 18. Citocinas produzidas nos sobrenadantes de culturas de monócitos e células tumorais. (A) – (E) – citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-4, respectivamente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. Barras de erro: erro padrão entre amostras.



6. DISCUSSÃO

De acordo com os dados a respeito do perfil sociodemográfico das pacientes deste estudo, a maioria das pacientes apresentaram menarca precoce (64%) e eram HPV-positivas (64%). Estes dados condizem com o fato de que o câncer de mama envolve vários fatores etiológicos, como exposição prolongada ou elevada ao estrogênio devido à menarca precoce, nuliparidade, idade tardia da menopausa, exposição a altas doses de radiação ionizante, consumo regular de álcool e dieta rica em gordura. Dentre os diferentes fatores etiológicos, a infecção pelo HPV tem sido relatada (Sun et. al., 2017; Islam et. al., 2020; Kashyap et. al., 2022).

Para avaliar os fatores de transcrição STAT4, JAK2, STAT3 e FOXO4 que podem ser usados como possíveis marcadores no contexto do microambiente tumoral do câncer de mama, foram realizadas análises de expressão gênica desses alvos. Na presença do HPV houve menor expressão dos genes STAT4, JAK2, STAT3 e STAT6 e maior expressão em amostras HPV-negativas, principalmente em STAT4. Sugerindo que o HPV pode estar atuando na supressão da via JAK/STAT. Nishi e colaboradores (2017) analisaram amostras de câncer gástrico e verificaram que a expressão de mRNA de STAT4 se correlaciona com a expressão de mRNA de IFN γ e que a sobrevida, em pacientes acometidos por esse tipo de câncer, é maior nos pacientes com alta expressão de STAT4 em comparação com pacientes apresentando baixa expressão (77,8% e 56,4%, respectivamente).

Quanto a expressão de JAK2, houve uma diminuição, quase basal, tanto para as amostras HPV-positivas quanto para as HPV-negativas. JAK2 é necessário para o início do câncer de mama em vários modelos genéticos de camundongos. Além disso, a elevação da atividade de JAK2/STAT5 poderia reduzir a apoptose de células pré-cancerosas em epitélio mamário que está relacionado a um alto risco de câncer de mama (Shao et. al. 2021). No trabalho de Morgan (2019), curiosamente, a inibição ou depleção de JAK2 e STAT5B no câncer cervical, resultou em uma redução na expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV. Nossos resultados para STAT3, STAT6 e FOXO4 não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. Porém, sabe-se que STAT3 apresenta papel pró-carcinogênico na infecção por HPV e carcinogênese cervical. O nível elevado de STAT3 e sua

ativação constitutiva no colo do útero e outros tecidos malignos são uma observação comum (Shao et. al. 2021). A expressão elevada de STAT3 está associada com baixa sobrevida na maioria dos tumores sólidos, como câncer gástrico, câncer de pulmão, câncer hepático, câncer de próstata e glioblastoma, mas com resultado favorável em câncer de mama (Thakur et. al., 2022).

A expressão de FOXO4 foi maior em amostras HPV-positivas, sugerindo que o HPV pode ter papel pró-tumoral no câncer de mama. FOXO4 inibe a proliferação e migração de células cancerosas gástricas (Jiramongkol et. al., 2020). Além disso, FOXO4 é considerado um supressor tumoral chave, regulando genes-alvo associados a estresse oxidativo, parada do ciclo celular e apoptose. Assim, a desregulação de FOXO4 pode levar a uma variedade de cânceres. É também alvo de medicamentos antitumorais, implicando FOXO4 como um potencial biomarcador para câncer (Liu et. al., 2020).

Além das análises dos fatores de transcrição no entendimento da relação entre o HPV e o câncer de mama, um estudo imunológico do microambiente tumoral também foi realizado para elucidar essa possível influência da infecção viral.

Normalmente, as principais células imunes infiltrantes de tumores isoladas do câncer de mama são as células T CD4+ e CD8+, além de células B e macrófagos associados ao tumor (Tay et. al., 2023). Por outro lado, eosinófilos, monócitos e células inativas natural killer (NK) estão presentes em quantidades menores no microambiente dos tumores de mama. Em geral, células T auxiliares CD4+ 1 (Th1), células T citotóxicas CD8+, células NK e macrófagos M1 têm uma atividade protetora contra o desenvolvimento tumoral, enquanto Treg, células T CD4+ (Th2) e macrófagos M2 podem promover o crescimento tumoral (Zhang et al., 2016; Alcazar et. al., 2020; Wang et al., 2021).

Em tumores de mama triplo negativos, observa-se um elevado número de linfócitos infiltrantes tumorais (Vikas et. al., 2018), o que também foi observado em nosso estudo através do aumento de células T CD4+ e citocina IL-2 em co-culturas de linfócitos e MDA-MB-231 transfectada. Porém, nossos dados mostraram diminuição da produção intracelular de citocinas, como IFN- γ , IL-17 e IL-10, causada por células T CD4+, e conseqüentemente diminuição da produção de citocinas Th1. Esses achados estão de acordo com um estudo de Meng Cao (2020), onde foi

observada uma mudança no perfil de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2 e TNF- α) para Th2 (IL-4), e correlacionado com infecções mais graves por HPV (Cao et. al., 2020).

Outro resultado importante observado nos linfócitos T CD4+ foi o aumento da frequência de células positivas para FOXP3, uma vez que essas células são conhecidas por suprimir a imunidade antitumoral e bloquear ataques, especialmente de linfócitos citotóxicos, contra células malignas (Nishikawa et. al., 2010). Na verdade, um estudo de Hayashi et al. (2022) em amostras de carcinoma espinocelular oral humano infectado por HPV, demonstraram um número aumentado de Tregs em carcinomas que suprimiam as respostas imunes antitumorais, o que contribuiu para o aparecimento e exacerbação de malignidades.

Sabe-se que as células T CD8+ e NK (CD56+) têm a função de eliminar células tumorais através do seu efeito citolítico mediado por perforinas e granzimas, associado à secreção de IFN- γ (Li et. al., 2021). Um estudo anterior também apontou que o TNF- α é essencial para a morte mediada por perforina em células de queratinócitos cervicais que expressam oncoproteínas E7, e que o IFN- γ facilitou a morte dessas células mesmo na ausência de perforina (Bhat et. al., 2018). Em nosso estudo, não foi observada alteração na quantidade de células T CD8+ estimuladas com células tumorais de mama (com ou sem transfecção).

Porém, é possível notar diminuição na produção de perforina e granzima em linfócitos estimulados com células tumorigênicas transfectadas (especialmente células transfectadas E5), demonstrando que a oncoproteína E5 do HPV provavelmente é capaz de diminuir a atividade citolítica do linfócito T CD8+. Além disso, também houve diminuição da produção intracelular de IFN- γ e IL-17 em linfócitos na presença de E6 e E7, e aumento de IL-10 em células transfectadas E5 e E6, diminuindo o perfil inflamatório e citolítico esperado de linfócitos T CD8+. Esses dados reforçam o papel das oncoproteínas E5 e E6 HPV16 no processo de evasão imunológica (Freitas et. al., 2017).

As oncoproteínas do HPV causaram diminuição da proliferação de células NK nas culturas de células transfectadas e, semelhantemente ao subtipo de linfócitos CD8+, foi observada supressão da resposta citolítica devido à baixa produção de perforina e acúmulo de granzima intracelular. A perforina é integrada à membrana celular, formando poros através dos quais as granzimas invadem a célula-alvo,

causando a morte celular (Cullen et al., 2007). Assim, a perforina desempenha um papel fundamental na entrega de granzimas às células-alvo, promovendo a citotoxicidade das células T e das células NK (Voskoboink et al., 2015).

A diminuição dos níveis de perforina pode indicar que as células imunes específicas do antígeno no microambiente tumoral estão sendo eliminadas (Mitilineos et al., 2020). O estudo de Wang (2020) em pacientes com tumor de mama mostrou uma maior liberação de granzima no sangue dos pacientes em comparação com amostras de tecido e a expressão de granzima e perforina em células de câncer de mama estava envolvida na citotoxicidade para essas células.

Semelhante aos achados de CD8+ houve uma diminuição na produção intracelular de IFN- γ e IL-17 em linfócitos NK de células transfectadas com E6 e E7 e um aumento da produção de IL-10 naquelas transfectadas com E5, o que indica uma modulação na atividade antitumoral de NK nas culturas experimentais. Outros estudos reforçam nossos achados, como o realizado por Gutierrez-Hoya (2021) que mostrou que no câncer cervical há maior percentual de células NK em lesões cervicais de baixo grau e lesões com baixa carga viral (Gutiérrez et. al., 2021). Além disso, Gosmann et. al. (2014) demonstraram um papel imunossupressor local da IL-17 em um modelo de camundongo com lesão pré-maligna associada ao HPV. Além disso, Wang (2013) tem sugerido que a IL-10 pode atuar na promoção tumoral no câncer cervical (Gosmann et. al., 2014; Wang et. al., 2013).

Em nosso estudo, as células CD14+ apresentaram redução em sua frequência na presença dos oncogenes E6 e E7, bem como de sua molécula coestimuladoras B7.1. Um estudo sobre câncer de pulmão detectou B7.1 e B7.2 principalmente em macrófagos infiltrantes de tumores, dos quais B7.1 foi associado a um pior prognóstico (Sato et. al., 2022).

Nossos resultados referentes às culturas sobrenadantes de linfócitos, os oncogenes E6 e E7 induziram principalmente a liberação de IL-2 Th1, IFN- γ e TNF- α e Th2 IL-4. Enquanto o oncogene E5 induziu apenas a liberação de IL-6 e IL-10. Esses achados associados à presença de E5, demonstram que esta oncoproteína pode ter um papel importante na evasão imune em tumores de mama, uma vez que a IL-10 pode interferir na apresentação do antígeno ao inibir a resposta inflamatória do hospedeiro e pode ser fortemente expressa em tecidos de câncer de mama

(Freitas et. al., 2017; Torres-Poveda et. al., 2014; Ariston et. al., 2020). Além disso, houve maior produção de IL-10 pelos linfócitos Treg, os quais estão associados à evasão imune, podem inibir a proliferação e ativação de linfócitos T efetores e a secreção de citocinas de linfócitos Th1, como INF- γ (Cao et. al., 2020; Wang et. al., 2017; Berti et. al., 2017).

Nos estágios mais avançados do carcinoma ductal, os tecidos tumorais são infiltrados por concentrações abundantes de células T e macrófagos M2, que produzem grandes quantidades de IL-6, promovendo metástase de células tumorais de mama. Isto foi evidenciado pelo facto de os níveis séricos de IL-6 em pacientes com carcinoma ductal serem significativamente mais elevados do que em mulheres saudáveis. Os níveis de TNF- α de mulheres com carcinoma em estágio III foram significativamente maiores quando comparado ao grupo de pacientes com câncer em estágio I e mulheres saudáveis (grupo controle). Este estudo indicou que apenas pacientes com tumores em estágios avançados secretam altos níveis de TNF- α (Ma et. al., 2017). Em nossas análises destacamos os resultados das células transfectadas com E6 e E7, que promoveram alta liberação de citocinas, incluindo IL-6 e TNF- α . Além disso, a IL-6 foi estimulada em todos os grupos experimentais.

CONCLUSÕES

Esse trabalho traz novas informações sobre a possível influência do HPV no câncer de mama. Verificamos através do perfil sociodemográfico das pacientes que a maioria apresentou menarca precoce e eram HPV-positivas, que corroboram com o fato de que o câncer de mama depende de fatores como exposição prolongada ou elevada ao estrogênio, assim como a possibilidade de agentes carcinogênicos estarem associados à gênese desse tipo de câncer. A análise de expressão gênica mostrou que na presença do HPV houve menor expressão dos genes STAT4, JAK2, STAT3 e STAT6 e maior expressão em amostras HPV-negativas, principalmente em STAT4. Sugerindo que o HPV pode estar atuando indiretamente na supressão da via JAK/STAT. Já a expressão de FOXO4 foi maior em amostras HPV-positivas, sugerindo que o HPV pode ter papel pró-tumoral no câncer de mama.

Quanto à resposta imune de linfócitos e monócitos em células tumorais de mama expressando os oncogenes E5, E6 e E7 do HPV. Nosso objetivo foi observar se as oncoproteínas do HPV inseridas na linhagem celular de câncer mamário podem estimular e alterar a resposta imunológica desencadeada por células imunológicas importantes do TME como linfócitos e monócitos. No geral, os resultados demonstraram que um provável papel do HPV em células com o perfil da MDA-MB-231 é de imunossupressão, aumentando as células T reguladoras e diminuindo a ação citolítica dos linfócitos T CD8+ e CD56+. Além disso, os oncogenes E6 e E7 estão associados à redução da frequência de monócitos, inibindo até mesmo o perfil M1 esperado. Essa investigação apresenta alguns pontos de aprimoramento metodológico, como maior tempo para as culturas e utilização de células mamárias HPV positivas coletadas de pacientes, por exemplo.

Em relação ao oncogene E5, nossos dados apontam que esta oncoproteína pode atuar na evasão imune em tumores de mama, através de IL-10 que em níveis alterados pode interferir na apresentação do antígeno e além disso E6 pode ser fortemente expressa em tecidos de câncer de mama. Contudo, acreditamos que este estudo possa destacar aspectos para o desenvolvimento de terapias imunobiológicas, visando o bloqueio das oncoproteínas do HPV. Mais estudos ainda são necessários para compreender os mecanismos do HPV e suas oncoproteínas no contexto do câncer de mama e as repercussões na prevenção e tratamento do câncer, incluindo estudos *in vivo* para validar os achados apresentados.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, Maura; USTOYEV, Yelena. Cancer and the immune system: the history and background of immunotherapy. In: **Seminars in oncology nursing**. WB Saunders, 2019. p. 150923.

ARISTON GABRIEL, A.N.; Wang, F.; Jiao, Q.; Yvette, U.; Yang, X.; Al-Ameri, S.A.; Du, L.; Wang, Y.S.; Wang, C. The Involvement of Exosomes in the Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer. **Mol. Cancer** 2020, 19, 1–9, doi:10.1186/s12943-020-01245-y.

Ariston Gabriel, A.N.; Wang, F.; Jiao, Q.; Yvette, U.; Yang, X.; Al-Ameri, S.A.; Du, L.; Wang, Y.S.; Wang, C. The Involvement of Exosomes in the Diagnosis and Treatment of Pancreatic Cancer. *Mol. Cancer* **2020**, 19, 1–9, doi:10.1186/s12943-020-01245-y.

ARNETH, B. **Tumor Microenvironment**. Medicina (B. Aires). 2019, doi:10.1002/jcb.21320.

ARNETH, Borros. **Tumor microenvironment**. Medicina, v. 56, n. 1, p. 15, 2019.

BAHCECIOGLU, Gokhan et al. **Breast cancer models**: Engineering the tumor microenvironment. Acta biomaterialia, v. 106, p. 1-21, 2020.

Balci FL, Uras C., Feldman SM O Papilomavírus Humano está Associado ao Câncer de Mama ou Papiloma Apresentando-se com Secreção Patológica do Mamilo? Tratamento de Câncer. Res. Comum. 2019; 19 :100122. doi: 10.1016/j.ctarc.2019.100122.

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

BERNARD, HANS-ULRICH et al. **Classification of papillomaviruses (PVs)** based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology, v. 401, n. 1, p. 70- 79, 2010.

BERNARD, Xavier et al. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. **PLoS one**, v. 6, n. 10, p. e25981, 2011.

BERTI, F.C.B.; Pereira, A.P.L.; Cebinelli, G.C.M.; Trugilo, K.P.; Brajão de Oliveira, K. The Role of Interleukin 10 in Human Papilloma Virus Infection and Progression to Cervical Carcinoma. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2017, 34, 1–13, doi:10.1016/j.cytogfr.2017.03.002.

Berti, F.C.B.; Pereira, A.P.L.; Cebinelli, G.C.M.; Trugilo, K.P.; Brajão de Oliveira, K. The Role of Interleukin 10 in Human Papilloma Virus Infection and Progression to Cervical Carcinoma. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2017**, 34, 1–13, doi:10.1016/j.cytogfr.2017.03.002.

BHAT, P.; Bergot, A.S.; Waterhouse, N.; Frazer, I.H. **Human Papillomavirus E7 Oncoprotein Expression by Keratinocytes Alters the Cytotoxic Mechanisms Used by CD8 T Cells.** *Oncotarget* 2018, 9, 6015–6027, doi:10.18632/oncotarget.23210.

BOSCH, F. XAVIER; DE SANJOSÉ, SILVIA. Chapter 1: **Human papillomavirus and cervical cancer**—burden and assessment of causality. JNCI monographs, v. 2003, n. 31, p. 3-13, 2003

CAO, M.; Wang, Y.; Wang, D.; Duan, Y.; Hong, W.; Zhang, N.; Shah, W.; Wang, Y.; Chen, H. Increased High-Risk **Human Papillomavirus Viral Load Is Associated with Immunosuppressed Microenvironment and Predicts a Worse Long-Term Survival in Cervical Cancer Patients.** *Am. J. Clin. Pathol.* 2020, 153, 502–512, doi:10.1093/ajcp/aqz186.

Cao, M.; Wang, Y.; Wang, D.; Duan, Y.; Hong, W.; Zhang, N.; Shah, W.; Wang, Y.; Chen, H. Increased High-Risk Human Papillomavirus Viral Load Is Associated with Immunosuppressed Microenvironment and Predicts a Worse Long-Term Survival in Cervical Cancer Patients. *Am. J. Clin. Pathol.* **2020**, 153, 502–512, doi:10.1093/ajcp/aqz186.

Chagas, et al. Avaliação de possível alteração nos genes E6 e E7 do papilomavírus humano tipos 18 e 31 e sua relação com o polimorfismo do códon 72 do gene TP53 em lesões de colo de útero de pacientes da região Nordeste do Brasil. 2010 86 F. **Dissertação em Genética e Biologia Molecular**) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 2010.

CIRQUEIRA, M.B.; Moreira, M.A.R.M.; Soares, L.R.; Freitas-Júnior, R. **Subtipos Moleculares Do Câncer de Mama.** *Femina* 2011, 39, 499–503.

CLAVREUL; POTRON; COUEZ. Vitamin D differentially regulates B7. 1 and B7. 2 expression on human peripheral blood monocytes. **Immunology**, v. 95, n. 2, p. 272-277, 1998.

CONLON, Kevin C.; MILJKOVIC, Milos D.; WALDMANN, Thomas A. **Cytokines in the treatment of cancer**. Journal of Interferon & Cytokine Research, v. 39, n. 1, p. 6-21, 2019.

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

DE CAROLIS, Sabrina et al. HPV DNA associates with breast cancer malignancy and it is transferred to breast cancer stromal cells by extracellular vesicles. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 860, 2019.

De Freitas, A.C.; De Oliveira, T.H.A.; Barros, M.R.; Venuti, A. HrHPV E5 Oncoprotein: **Immune Evasion and Related Immunotherapies**. J. Exp. Clin. Cancer Res. 2017, 36, 1–15, doi:10.1186/s13046-017-0541-1.

DE SOUZA, Juliana Lane Pacheco et al. Perfil histopatológico e molecular do câncer de mama em mulheres assistidas em centro de oncologia do Agreste Pernambucano. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 38-46, 2019.

DETHLEFSEN, Christine; HØJFELDT, Grith; HOJMAN, Pernille. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 138, n. 3, p. 657-664, 2013.

Dunne MR, Phelan JJ, Michielsen AJ, Maguire AA, Dunne C, Martin P, Noonan S, Tosetto M, Geraghty R, Fennelly D, Sheahan K, Ryan EJ, O'Sullivan J. Characterising the prognostic potential of HLA-DR during colorectal cancer development. *Cancer Immunol Immunother*. 2020 Aug;69(8):1577-1588. doi: 10.1007/s00262-020-02571-2. Epub 2020 Apr 18. PMID: 32306077; PMCID: PMC7347515.

Favre M, Ramoz N and Orth G (1997). Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol**; 15(2):181-98.

FAVRE M, RAMOZ N, ORTH G. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol**; v. 5, n.2, p.181-98. 1997.

Figueiredo, C.; Oldhafer, F.; Wittauer, E.M.; Carvalho-Oliveira, M.; Akhdar, A.; Beetz, O.; Chen-Wacker, C.; Yuzefovych, Y.; Falk, C.S.; Blasczyk, R.; et al. Silencing

of HLA Class I on Primary Human Hepatocytes as a Novel Strategy for Reduction in Alloreactivity. *J. Cell. Mol. Med.* 2019, 23, 5705–5714, doi:10.1111/jcmm.14484.

Figueiredo, C.; Oldhafer, F.; Wittauer, E.M.; Carvalho-Oliveira, M.; Akhdar, A.; Beetz, O.; Chen-Wacker, C.; Yuzefovych, Y.; Falk, C.S.; Blasczyk, R.; et al. Silencing of HLA Class I on Primary Human Hepatocytes as a Novel Strategy for Reduction in Alloreactivity. *J. Cell. Mol. Med.* 2019, 23, 5705–5714, doi:10.1111/jcmm.14484.

FURTH, Priscilla A. STAT signaling in different breast cancer subtypes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 612-615, 2014.

Gil Del Alcazar, C.R.; Alečković, M.; Polyak, K. Immune Escape during Breast Tumor Progression: **Immune-Related Changes during Breast Tumor Progression**. *Cancer Immunol Res.* 2020, 8, 422–427, doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0786.Immune.

Gil Del Alcazar, C.R.; Alečković, M.; Polyak, K. Immune Escape during Breast Tumor Progression: Immune-Related Changes during Breast Tumor Progression. *Cancer Immunol Res.* 2020, 8, 422–427, doi:10.1158/2326-6066.CIR-19-0786.Immune.

GLOBOCAN, 2022. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0> Acesso em: 13, de maio, 2022.

GOBBI, Helenice. Classification of tumours of the breast: an update based on the new 2012 World Health Organization Classification. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 463-474, 2012.

GOBBI, Helenice. Classification of tumours of the breast: an update based on the new 2012 World Health Organization Classification. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 463-474, 2012.

Gosmann, C.; Mattarollo, S.R.; Bridge, J.A.; Frazer, I.H.; Blumenthal, A. IL-17 Suppresses Immune Effector Functions in HPV-Associated Epithelial Hyperplasia1. *J Immunol* 2014, 193, 2248–2257, doi:10.4049/jimmunol.1400216.IL-17.

Gosmann, C.; Mattarollo, S.R.; Bridge, J.A.; Frazer, I.H.; Blumenthal, A. IL-17 Suppresses Immune Effector Functions in HPV-Associated Epithelial Hyperplasia1. *J Immunol* **2014**, *193*, 2248–2257, doi:10.4049/jimmunol.1400216.IL-17.

GUNDUZ, Mehmet; GUNDUZ, Esra (Ed.). **Breast Cancer: Focusing Tumor Microenvironment**, Stem Cells and Metastasis. BoD–Books on Demand, 2011.

GUPTA, I.; Ulamec, M.; Peric-Balja, M.; Ramic, S.; Al Moustafa, A.E.; Vranic, S.; Al-Farsi, H.F. Presence of High-Risk HPVs, EBV, and MMTV in Human Triple-Negative Breast Cancer. **Hum. Vaccines Immunother.** 2021, *17*, 4457–4466, doi:10.1080/21645515.2021.1975452.

GUPTA, Ishita et al. Presence of high-risk HPVs, EBV, and MMTV in human triple-negative breast cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, p. 1-10, 2021.

Gutiérrez-Hoya A, Soto-Cruz I. NK Cell Regulation in Cervical Cancer and Strategies for Immunotherapy. *Cells*. 2021 Nov 10;10(11):3104. doi: 10.3390/cells10113104. PMID: 34831327; PMCID: PMC8619016.

Gutiérrez-Hoya, A.; Soto-Cruz, I. NK Cell Regulation in Cervical Cancer and Strategies for Immunotherapy. **Cells** **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10113104.

Gutiérrez-Hoya, A.; Soto-Cruz, I. NK Cell Regulation in Cervical Cancer and Strategies for Immunotherapy. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10113104.

Haghshenas MR, Mousavi T., Moosazadeh M., Afshari M. Human Papillomavirus and Mama Cancer in Iran: A Meta-Analysis. *Irã. J. Medicina Básica. ciência* 2016; *19* :231–237

HARDEN, Mallory E.; MUNGER, Karl. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 3-12, 2017.

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

Hinshaw DC, Shevde LA. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 2019 Sep 15;79(18):4557-4566. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3962. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31350295; PMCID: PMC6744958.

HORNSVELD, M. et al. Re-evaluating the role of FOXOs in cancer. In: *Seminars in cancer biology*. **Academic Press**, 2018. p. 90-100.

INCA 2022 taxa ajustada de mortalidade por federação
<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/mortalidade>

INCA Estimativa 2020 : Incidência de Câncer No Brasi; 2020; ISBN 9788573183887.

INCA. Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil. 2022.

Islam, M.S.; Chakraborty, B.; Panda, C.K. Human Papilloma Virus (HPV) Profiles in Breast Cancer: Future Management. *Ann. Transl. Med.* 2020, 8, 650–650, doi:10.21037/atm-19-2756.

ISLAM, Md Saimul; CHAKRABORTY, Balarko; PANDA, Chinmay Kumar. Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. *Annals of translational medicine*, v. 8, n. 10, 2020.

ISLAM, Md Saimul; CHAKRABORTY, Balarko; PANDA, Chinmay Kumar. Human papilloma virus (HPV) profiles in breast cancer: future management. *Annals of translational medicine*, v. 8, n. 10, 2020.

JIMENEZ, AMJ et al. Regulation of human oncogenes' expression by human papillomavirus (HPV) 16 E6 protein. *Journal of Metallomics and Jiramongkol Y, Lam EW. FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. Cancer Metastasis Rev.* 2020 Sep;39(3):681-709. doi: 10.1007/s10555-020-09883-w. PMID: 32372224; PMCID: PMC7497309.

Kashyap D, Pal D, Sharma R, Garg VK, Goel N, Koundal D, Zaguia A, Koundal S, Belay A. Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures. *Biomed Res Int.* 2022 Apr 18;2022:9605439. doi: 10.1155/2022/9605439. PMID: 35480139; PMCID: PMC9038417.

KASHYAP, Dharambir et al. Global increase in breast cancer incidence: risk factors and preventive measures. *BioMed research international*, v. 2022, 2022.

KEEN, J.C. Breast Cancer Cell Line Development and Authentication; 2011; KUDELA, Erik et al. HPV-Associated Breast Cancer: Myth or Fact?. *Pathogens*, v. 11, n. 12, p. 1510, 2022.

Laskowski TJ, Biederstädt A, Rezvani K. Natural killer cells in antitumour adoptive cell immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2022 Oct;22(10):557-575. doi: 10.1038/s41568-022-00491-0. Epub 2022 Jul 25. PMID: 35879429; PMCID: PMC9309992.

LI, Bi-Lan; WAN, Xiao-Ping. Prognostic significance of immune landscape in tumour microenvironment of endometrial cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 24, n. 14, p. 7767-7777, 2020.

LI, J.J.; Tsang, J.Y.; Tse, G.M. Tumor Microenvironment in Breast Cancer—Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment. *Cancers (Basel)*. 2021, 13, doi:10.3390/cancers13164233.

LIMA, Elyda Gonçalves de. Detecção e análise do Papilomavírus humano (HPV) em carcinomas mamários de mulheres do Nordeste do Brasil. 2016.

LIPPITZ, Bodo E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *The lancet oncology*, v. 14, n. 6, p. e218-e228, 2013.

LIU, Wen; LI, Yong; LUO, Bing. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, p. 651-663, 2020.

LIU, Wen; LI, Yong; LUO, Bing. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, p. 651-663, 2020.

LONG DL, Song HL and Qu PP (2021) Cytokines profiles in cervical mucosa in patients with cervical high-risk human papillomavirus infection. *J Infect Dev Ctries* 15:719–725. doi: 10.3855/JIDC.12147.

Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020 May;77(9):1745-1770. doi: 10.1007/s00018-019-03351-7. Epub 2019 Nov 6. PMID: 31690961; PMCID: PMC7190605.

MA, Y.; Ren, Y.; Dai, Z.J.; Wu, C.J.; Ji, Y.H.; Xu, J. IL-6, IL-8 and TNF- α Levels Correlate with Disease Stage in Breast Cancer Patients. *Adv. Clin. Exp. Med*. 2017, 26, 421–426, doi:10.17219/acem/62120.

Ma, Y.; Ren, Y.; Dai, Z.J.; Wu, C.J.; Ji, Y.H.; Xu, J. IL-6, IL-8 and TNF- α Levels Correlate with Disease Stage in Breast Cancer Patients. *Adv. Clin. Exp. Med*. **2017**, 26, 421–426, doi:10.17219/acem/62120.

MAVUNDZA, E.J.; Iwu-Jaja, C.J.; Wiyeh, A.B.; Gausi, B.; Abdullahi, L.H.; Halle-Ekane, G.; Wiysonge, C.S. A Systematic Review of Interventions to Improve Hpv Vaccination Coverage. *Vaccines* 2021, 9, 1–30, doi:10.3390/vaccines9070687.

MAVUNDZA, Edison J. et al. A Systematic Review of Interventions to Improve HPV Vaccination Coverage. *Vaccines*, v. 9, n. 7, p. 687, 2021.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.

MORGAN, Ethan L.; MACDONALD, Andrew. JAK2 inhibition impairs proliferation and sensitises cervical cancer cells to cisplatin-induced cell death. *Cancers*, v. 11, n. 12, p. 1934, 2019.

MURPHY, K. *Imunobiologia de Janeway – 8ª edição – Ed. Artmed. Porto Alegre* 2014.

NAIR, Meera; SANDHU, Sardul Singh; SHARMA, Anil Kumar. Cancer molecular markers: A guide to cancer detection and management. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2018. p. 39-55.

Nishi M., Batsaikhan B.E., Yoshikawa K., Higashijima J., Tokunaga T., Takasu C., Kashihara H., Ishikawa D., Shimada M. High STAT4 Expression Indicates Better Disease-free Survival in Patients with Gastric Cancer. *Anticancer Res.* 2017;37:6723–6729. doi: 10.21873/anticancerres.12131.

NISHIKAWA, H.; Sakaguchi, S. Regulatory T Cells in Tumor Immunity. *Int. J. Cancer* 2010, 127, 759–767, doi:10.1002/ijc.25429.

Nishikawa, H.; Sakaguchi, S. Regulatory T Cells in Tumor Immunity. *Int. J. Cancer* **2010**, 127, 759–767, doi:10.1002/ijc.25429.

OLIVEIRA, Mariana Freitas de et al. Estudo retrospectivo de pacientes diagnosticados com câncer de mama internados em hospital universitário. *Rev Bras Mastologia*, v. 26, n. 2, p. 50-55, 2016.

OWEN, Katie L.; BROCKWELL, Natasha K.; PARKER, Belinda S. JAK-STAT signaling: a double-edged sword of immune regulation and cancer progression. *Cancers*, v. 11, n. 12, p. 2002, 2019.

PAO C.C., Hor J.J., Yang F.P., Lin C.Y., Tseng C.J. Detection of Human Papillomavirus MRNA and Cervical Cancer Cells in Peripheral Blood of Cervical Cancer Patients with Metastasis. *J. Clin. Oncol.* 1997;15:1008–1012. doi: 10.1200/JCO.1997.15.3.1008

PATYSHEVA, M.; Larionova, I.; Stakheyeva, M.; Grigoryeva, E.; Iamshchikov, P.; Tarabanovskaya, N.; Weiss, C.; Kardashova, J.; Frolova, A.; Rakina, M.; et al.

Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Front. Oncol.* 2022, 11, 1–12, doi:10.3389/fonc.2021.800235.

Patysheva, M.; Larionova, I.; Stakheyeva, M.; Grigoryeva, E.; Iamshchikov, P.; Tarabanovskaya, N.; Weiss, C.; Kardashova, J.; Frolova, A.; Rakina, M.; et al. Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Front. Oncol.* **2022**, 11, 1–12, doi:10.3389/fonc.2021.800235.

RIBEIRO-SILVA, Alfredo et al. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 127, n. 3, p. 336-340, 2003.

SARAIVA, D.P.; Azeredo-Lopes, S.; Antunes, A.; Salvador, R.; Borralho, P.; Assis, B.; Pereira, I.L.; Seabra, Z.; Negreiros, I.; Jacinto, A.; et al. Expression of Hla-Dr in Cytotoxic t Lymphocytes: A Validated Predictive Biomarker and a Potential Therapeutic Strategy in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021, 13, doi:10.3390/cancers13153841.

Saraiva, D.P.; Azeredo-Lopes, S.; Antunes, A.; Salvador, R.; Borralho, P.; Assis, B.; Pereira, I.L.; Seabra, Z.; Negreiros, I.; Jacinto, A.; et al. Expression of Hla-Dr in Cytotoxic t Lymphocytes: A Validated Predictive Biomarker and a Potential Therapeutic Strategy in Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **2021**, 13, doi:10.3390/cancers13153841.

SATO, T.; Takagi, K.; Higuchi, M.; Abe, H.; Kojimahara, M.; Sagawa, M.; Tanaki, M.; Miki, Y.; Suzuki, T.; Hojo, H. Immunolocalization of CD80 and CD86 in Non-Small Cell Lung Carcinoma: CD80 as a Potent Prognostic Factor. *Acta Histochem. Cytochem.* 2022, 55, 25–35, doi:10.1267/ahc.21-00075.

Sato, T.; Takagi, K.; Higuchi, M.; Abe, H.; Kojimahara, M.; Sagawa, M.; Tanaki, M.; Miki, Y.; Suzuki, T.; Hojo, H. Immunolocalization of CD80 and CD86 in Non-Small Cell Lung Carcinoma: CD80 as a Potent Prognostic Factor. *ACTA Histochem. Cytochem.* **2022**, 55, 21–00075, doi:10.1267/ahc.21-00075.

Scheau C, Badarau IA, Costache R, Caruntu C, Mihai GL, Didilescu AC, Constantin C, Neagu M. The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2019 Nov 26;2019:9423907. doi: 10.1155/2019/9423907. PMID: 31886121; PMCID: PMC6899323.

SHAO, Fei; PANG, Xiaonan; BAEG, Gyeong H. Targeting the JAK/STAT signaling pathway for breast cancer. **Current medicinal chemistry**, v. 28, n. 25, p. 5137-5151, 2021.

SOUTO R, FALHARI JPB, DA CRUZ AD. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Rev Bras Cancerologia*; v.51, p.155-160. 2005.

SOYSAL, Savas D.; TZANKOV, Alexandar; MUENST, Simone E. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. *Pathobiology*, v. 82, n. 3-4, p. 142-152, 2015.

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

Sun Y.-S., Zhao Z., Yang Z.-N., et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences* . 2017;13(11):p. 1387.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017 Nov 1;13(11):1387-1397. doi: 10.7150/ijbs.21635. PMID: 29209143; PMCID: PMC5715522.

Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017 Nov 1;13(11):1387-1397. doi: 10.7150/ijbs.21635. PMID: 29209143; PMCID: PMC5715522.

SUNG, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin*. 2021, 71, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.

SYROWATKA, Ania et al. Predictors of distress in female breast cancer survivors: a systematic review. **Breast cancer research and treatment**, v. 165, p. 229-245, 2017.

SZYMONOWICZ, Klaudia Anna; CHEN, Junjie. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer biology & medicine*, v. 17, n. 4, p. 864, 2020.

TAN, SHYH-HAN et al. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. *Journal of virology*, v. 72, n. 5, p. 3610-3622, 1998.

THAKUR, Kulbhushan et al. Investigation of molecular mechanisms underlying JAK/STAT signaling pathway in HPV-induced cervical carcinogenesis using 'omics' approach. *Medical Oncology*, v. 39, n. 12, p. 255, 2022.

THENNAVAN A, Beca F, Xia Y, Recio SG, Allison K, Collins LC, Tse GM, Chen YY, Schnitt SJ, Hoadley KA, Beck A, Perou CM. Molecular analysis of TCGA breast cancer histologic types. *Cell Genom.* 2021 Dec 8;1(3):100067. doi: 10.1016/j.xgen.2021.100067. PMID: 35465400; PMCID: PMC9028992.

TIMBANG, M.R.; Sim, M.W.; Bewley, A.F.; Farwell, D.G.; Mantravadi, A.; Moore, M.G. HPV-Related Oropharyngeal Cancer: A Review on Burden of the Disease and Opportunities for Prevention and Early Detection. *Hum. Vaccines Immunother.* 2019, 15, 1920–1928, doi:10.1080/21645515.2019.1600985.

TIMBANG, Mary Roz et al. HPV-related oropharyngeal cancer: a review on burden of the disease and opportunities for prevention and early detection. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 2019.

TORRES-POVEDA, K.; Bahena-Román, M.; Madrid-González, C.; Burguete-García, A.I.; Bermúdez-Morales, V.H.; Peralta-Zaragoza, O.; Madrid-Marina, V. Role of IL-10 and TGF- β 1 in Local Immunosuppression in HPV-Associated Cervical Neoplasia. *World J. Clin. Oncol.* 2014, 5, 753–763, doi:10.5306/wjco.v5.i4.753.

Torres-Poveda, K.; Bahena-Román, M.; Madrid-González, C.; Burguete-García, A.I.; Bermúdez-Morales, V.H.; Peralta-Zaragoza, O.; Madrid-Marina, V. Role of IL-10 and TGF- β 1 in Local Immunosuppression in HPV-Associated Cervical Neoplasia. *World J. Clin. Oncol.* **2014**, 5, 753–763, doi:10.5306/wjco.v5.i4.753.

TSANG, Julia YS; GARY, M. Tse. Molecular classification of breast cancer. **Advances in anatomic pathology**, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2020.

USMAN, Muhammad et al. Breast cancer risk and human papillomavirus infection: a Bradford Hill criteria based evaluation. **Infectious Disorders-Drug Targets** (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders), v. 22, n. 4, p. 41-50, 2022.

VIKAS, P.; Borcharding, N.; Zhang, W. The Clinical Promise of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Manag. Res.** 2018, 10, 6823–6833, doi:10.2147/CMAR.S185176.

Vikas, P.; Borchering, N.; Zhang, W. The Clinical Promise of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 6823–6833, doi:10.2147/CMAR.S185176.

VOUSDEN, Karen. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB journal*, v. 7, n. 10, p. 872-879, 1993.

Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA*. 2019 Jan 22;321(3):288-300. doi: 10.1001/jama.2018.19323. PMID: 30667505.

WANG, M.; Wei, Y.; Li, Y.; Li, H.; Jin, J.; Lu, Y.; Li, Q. Targeting Breast Cancer with a Combination of DNT and LAG3 Checkpoint Blockage and Its Mechanism. *Immunity, Inflamm. Dis.* 2022, *10*, 1–11, doi:10.1002/iid3.626.

WANG, M.; Zhang, C.; Song, Y.; Wang, Z.; Wang, Y.; Luo, F.; Xu, Y.; Zhao, Y.; Wu, Z.; Xu, Y. Mechanism of Immune Evasion in Breast Cancer. *Onco. Targets. Ther.* 2017, *10*, 1561–1573, doi:10.2147/OTT.S126424.

Wang, M.; Zhang, C.; Song, Y.; Wang, Z.; Wang, Y.; Luo, F.; Xu, Y.; Zhao, Y.; Wu, Z.; Xu, Y. Mechanism of Immune Evasion in Breast Cancer. *Onco. Targets. Ther.* **2017**, *10*, 1561–1573, doi:10.2147/OTT.S126424.

WANG, Ting et al. The role of human papillomavirus infection in breast cancer. *Medical Oncology*, v. 29, p. 48-55, 2012.

WANG, Xiangkun et al. Analysis of clinical significance and prospective molecular mechanism of main elements of the JAK/STAT pathway in hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*, v. 55, n. 4, p. 805-822, 2019.

WANG, Y.; LIU, X.-H.; LI, Y.-H.; LI, O. The Paradox of IL-10-Mediated Modulation in Cervical Cancer. *Biomed. Reports* 2013, *1*, 347–351, doi:10.3892/br.2013.69.

WANG, Y.; LIU, X.-H.; LI, Y.-H.; LI, O. The Paradox of IL-10-Mediated Modulation in Cervical Cancer. *Biomed. Reports* **2013**, *1*, 347–351, doi:10.3892/br.2013.69.

WANG, Yu; ZHOU, Yanmin; GRAVES, Dana T. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *BioMed research international*, v. 2014, 2014.

WHO, 2020. Disponível em < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast->

cancer#:~:text=In%202020%2C%20there%20were%202.3,the%20world's%20most%20prevalent%20cancer. > Acesso em 14 de maio, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION World Health Statistics. World Health, 1-177; 2022; ISBN 9789240051140.

WYSOCKA, Joanna. New WHO classification of breast tumours—as published in 2019. Nowotwory. *Journal of Oncology*, v. 70, n. 6, p. 250-252, 2020.

XIAO, Yi; YU, Dihua. **Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer.** *Pharmacology & therapeutics*, v. 221, p. 107753, 2021.

XIONG W.-M., Xu Q.-P., Li X., Xiao R.-D., Cai L., He F. A Associação entre Infecção por Papilomavírus Humano e Câncer de Pulmão: Uma Revisão do Sistema e Meta- Análise. *Oncotarget*. 2017; 8 :96419–96432. doi: 10.18632/oncotarget.21682

YANG, Y.; Guo, Z.; Chen, W.; Wang, X.; Cao, M.; Han, X.; Zhang, K.; Teng, B.; Cao, J.; Wu, W.; et al. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Angiogenesis and Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Targeting E2F2. *Mol. Ther.* 2021, 29, 1226–1238, doi:10.1016/j.ymthe.2020.11.024.

Yang, Y.; Guo, Z.; Chen, W.; Wang, X.; Cao, M.; Han, X.; Zhang, K.; Teng, B.; Cao, J.; Wu, W.; et al. M2 Macrophage-Derived Exosomes Promote Angiogenesis and Growth of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Targeting E2F2. *Mol. Ther.* **2021**, 29, 1226–1238, doi:10.1016/j.ymthe.2020.11.024.

YUAN, Y.; Cai, X.; Shen, F.; Ma, F. HPV **Post-Infection Microenvironment and Cervical Cancer.** *Cancer Lett.* 2021, 497, 243–254, doi:10.1016/j.canlet.2020.10.034.

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

ZHANG L, Mao Z, Lai Y, Wan T, Zhang K and Zhou B (2020) A review of the research progress in Tlymphocyte immunity and cervical cancer. **Transl Cancer Res** 9:2026–2036. doi: 10.21037/tcr.2020.01.33

ZHANG Y., Fan S., Meng Q., Ma Y., Katiyar P., Schlegel R., Rosen EM BRCA1 Interaction with Human Papillomavirus Oncoproteins. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 :33165–33177. doi: 10.1074/jbc.M505124200

ZHANG, N.; Ma, Z.P.; Wang, J.; Bai, H.L.; Li, Y.X.; Sun, Q.; Yang, L.; Tao, L.; Zhao, J.; Cao, Y.W.; et al. Human Papillomavirus Infection Correlates with Inflammatory Stat3 Signaling Activity and IL-17 **Expression in Patients with Breast Cancer.** *Am. J. Transl. Res.* 2016, 8, 3214–3226.

ZHANG, Nan et al. Human papillomavirus infection correlates with inflammatory Stat3 signaling activity and IL-17 expression in patients with breast cancer. **American journal of translational research**, v. 8, n. 7, p. 3214, 2016.

ZHAO H, Wu L, Yan G, Chen Y, Zhou M, Wu Y and Li Y (2021) Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* 2021 6:1–46. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5

ZHOU, C.; Tuong, Z.K.; Frazer, I.H. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. **Front. Oncol.** 2019, 9, 682, doi:10.3389/FONC.2019.00682/BIBTEX.

ZHOU, J.; Tang, Z.; Gao, S.; Li, C.; Feng, Y.; Zhou, X. Tumor-Associated Macrophages: **Recent Insights and Therapies**. *Front. Oncol.* 2020, 10, 1–13, doi:10.3389/fonc.2020.00188.

Zhou, J.; Tang, Z.; Gao, S.; Li, C.; Feng, Y.; Zhou, X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Front. Oncol.* **2020**, 10, 1–13, doi:10.3389/fonc.2020.00188.

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1288, n. 2, p. F55-F78, 1996.

ANEXO A - PUBLICAÇÕES PRODUZIDAS DURANTE O DOUTORADO

Virus Research 290 (2020) 198143



Contents lists available at ScienceDirect

Virus Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/virusres

Structural and functional impacts of E5 genetic variants of human papillomavirus type 31

Ruany C. de O. Silva^{a,1}, Antônio Humberto P. da Silva Júnior^{e,1}, Ana P.A.D. Gurgel^b, Marconi R. Barros Junior^a, Daffany L. Santos^a, Rita de C.P. de Lima^a, Marcus V.A. Batista^c, Lindomar J. Pena^d, Bárbara S. Chagas^a, Antonio C. Freitas^{a,*}

^a Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

^b Department of Engineering and Environment, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil

^c Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology (GMBio), Department of Biology, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil

^d Department of Virology and Experimental Therapy, Research Center Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Pernambuco, Brazil

^e Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
human papillomavirus 31
E5
variants
functional analysis

ABSTRACT

Persistent infections caused by high-risk human papillomavirus (HR-HPV) are important, for the development of cervical lesions, but environmental and genetic factors are also related in the process of carcinogenesis. Among the genetic factors, the genetic variants of HR-HPV appear to be related to the risk of persistent infections. Therefore, the present study investigates variants of HPV31 E5 oncogene in cervical scraping samples from

Article

E7 Oncogene HPV58 Variants Detected in Northeast Brazil: Genetic and Functional Analysis

Bárbara Simas Chagas ^{1,†}, Elias Tibúrcio Júnior ^{1,†}, Ruany Cristyne de Oliveira Silva ¹, Daffany Luana dos Santos ¹, Marconi Rego Barros Junior ¹, Rita de Cássia Pereira de Lima ¹, Maria da Conceição Viana Invenção ¹, Vanessa Emanuelle Pereira Santos ¹, Pedro Luiz França Neto ¹, Antônio Humberto Silva Júnior ², Jacinto Costa Silva Neto ³, Marcus Vinícius de Aragão Batista ⁴ and Antonio Carlos de Freitas ^{1,*}

¹ Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil; babisimas@gmail.com (B.S.C.); eliasbiomedico@gmail.com (E.T.J.); ruanycristyne@hotmail.com (R.C.d.O.S.); daffanyluana94@gmail.com (D.L.d.S.); marconijrr@gmail.com (M.R.B.J.); ritajpbio@gmail.com (R.d.C.P.d.L.); maria.conceicao@ufpe.br (M.d.C.V.I.); vanessa.emanuelle@ufpe.br (V.E.P.S.); pedro.francaneto@ufpe.br (P.L.F.N.)

² Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Campina Grande, Campina Grande 2504009, PB, Brazil; antoniohumbertojr@yahoo.com.br

³ Laboratory of Molecular and Cytological Research, Department of Histology, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, PE, Brazil; jacinto.costa@ufpe.br

⁴ Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, Department of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão 49100-000, SE, Brazil; mbatista@academico.ufs.br

* Correspondence: antonio.cfreitas@ufpe.br; Fax: +55-81-21268522.

† These authors contributed equally to this work.

Citation: Chagas, B.S.; Tibúrcio Júnior, E.; Silva, R.C.d.O.; Santos, D.L.d.; Barros Junior, M.R.;

Abstract: Cervical cancer is associated with persistent infections by high-risk Human Papillomavirus (HPV) types that may have nucleotide polymorphisms and, consequently, different oncogenic potentials. Therefore, this study aimed to evaluate the genetic variability and structural



Contents lists available at ScienceDirect

Genomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygeno

Functional evaluation of human papillomavirus type 31 long control region variants



Ruany C.O. Silva^a, Rita de Cássia P. Lima^a, Marcelo N. Cordeiro^a, Daffany L. dos Santos^a, Lindomar J. Pena^b, Ana P.A.D. Gurgel^c, Marcus V.A. Batista^d, Bárbara S. Chagas^a, Antonio C. Freitas^{a,*}

^a Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Brazil

^b Department of Virology and Experimental Therapy, Research Center Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, Pernambuco, Brazil

^c Department of Engineering and Environment, Federal University of Paraíba, Paraíba, Brazil

^d Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, Department of Biology, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Sergipe, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

HPV-31

Long control region (LCR)

Luciferase

ABSTRACT

Persistent infections by high-risk human papillomavirus (HR-HPV) are a necessary condition, but not sufficient for cervical cancer development. Genetic variants of HR-HPV appear to be related to the risk of persistent infections. The study performed a functional evaluation of variants of the HPV-31 promoter region (LCR). For this, cloning and subcloning of variants HPV-31/UFPE-21 HPV-31/UFPE-89, HPV-31/UFPE-66, E2 gene and prototype HPV-31 were performed. Transfection with different concentrations of E2 was done and the concentration of 25 ng was determined to be ideal for LCR activation. HPV-31/UFPE-21 and HPV-31/UFPE-89 have a greater ability to alter *Nluc* reporter gene expression levels and HPV-31/UFPE-66 showed decreased levels of gene expression of *Nluc* reporter gene compared to control. Statistical analysis showed a significant difference between the polymorphic LCR regions and the control ($p < 0.0001$). A more refined profile of variants of HPV-31 and its importance for the prognosis of cervical lesions begins to be drawn.



Expression of the Oncoprotein E5 from *Human papillomavirus* and miR-203 in Pre-Cancer Lesions and Cervical Cancer

Talita Helena Araújo de Oliveira¹, Marconi Rego Barros Jr¹, Daffany Luana dos Santos¹, Ruany Cristyne de Oliveira Silva¹, Bianca São Marcos¹, Kamylla Conceição Gomes Nascimento¹, Lígia Rosa Sales Leal¹, Jacinto Costa da Silva Neto², Anna Jéssica Duarte Silva¹ and Antonio Carlos de Freitas^{1*}

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco UFPE, Brazil

²Department of Embryology and Histology, Federal University of Pernambuco UFPE, Brazil

Abstract

High-risk *Human papillomavirus* (HPV) plays a key role in cervical cancer development due to its oncoprotein activities. The most frequent genotype in cervical lesions around the world is HPV-16, but other types are also founded, and the presence of multi-infection is associated with a higher risk of cervical cancer. E5 viral oncoprotein has a large range of tumorigenic attributes, including the modulation of microRNAs expression and previous *in vitro* studies have found an inverse relationship between E5 and microRNA-203, although no direct correlation was reported. Therefore, this study aimed to evaluate the profile of HPV infection and the possible correlation between E5 and microRNA-203 expression. Eighty-one fresh biopsies classified as normal tissue, cervical intraepithelial neoplasia grade (I, II, and III), and cancer were analyzed by qPCR. 83.95% of the samples were positive for HPV infection, and HPV-16 was the most prevalent, followed by HPV-31, HPV-58, HPV-18, and HPV-33. 29.41% of the samples were positive for more than one type (HPV-16 and HPV-31; HPV-16 and HPV58; HPV-31 and HPV-58; HPV-33 and HPV-58; HPV-18 and HPV-31; HPV-58 and HPV-18; HPV-16 and HPV-31 and HPV-18). We observed

OPEN ACCESS

*Correspondence:

ANEXO B - PUBLICAÇÕES EM ANDAMENTO

IMMUNOLOGICAL RESPONSE AGAINST BREAST LINEAGE CELLS TRANSFECTED WITH HUMAN PAPILOMAVIRUS (HPV)

Daffany Luana Santos [†], Bianca de França São Marcos [†], Georon Ferreira de Sousa [‡], Leonardo Carvalho de Oliveira Cruz [‡], Bárbara Rafaela da Silva Barros [‡], Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira [‡], Talita Helena de Araújo Oliveira [‡], Anna Jessica Duarte Silva [‡], Vanessa Emanuelle Pereira Santos [‡], Cristiane Moutinho Lagos de Melo [‡] and Antonio Carlos de Freitas ^{‡*}

- ¹ Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brazil - CEP: 50670-901; daffanyluana94@gmail.com, biancasaomarcos@gmail.com, duarte.annaj@gmail.com, vanessa.emanuelle@ufpe.br, acf_ufpe@yahoo.com.br
- ² Immunological and Antitumor Analysis Laboratory, Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brazil - CEP: 50670-901; georon.sousa@gmail.com, leocarvalhocruz3556@gmail.com, barbarabarrosbio@gmail.com, cristianemout@gmail.com
- ³ Vitória Academic Center, Federal University of Pernambuco - Rua do Alto do Reservatório s/n Bela Vista 55608680 - Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil; marianelira@gmail.com
- ⁴ Patrick G Johnston center for Cancer Research, Queen's University Belfast; t.oliveira@qub.ac.uk
- * Correspondence: Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brazil - CEP: 50670-901; acf_ufpe@yahoo.com.br

[†] These authors contributed equally to this work

Immunological response induced by lung adenocarcinoma cell lineage transfected with HPV oncogenes.

Bianca de França São Marcos¹, Daffany Luana dos Santos¹, Georon Ferreira de Souza², Leonardo Carvalho de Oliveira Cruz², Bárbara Rafaela da Silva Barros², Vanessa Emanuelle Pereira Santos, Talita Helena de Araújo Oliveira³, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^{2*}, Antonio Carlos de Freitas^{1**}.

¹ Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brazil - CEP: 50670-901.

² Immunological and Antitumor Analysis Laboratory, and Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária Recife, Pernambuco, Brazil - CEP: 50670-901.

³ Patrick G jonhston Centre for Cancer research, Queen's University Belfast, Northern Ireland

*These authors are senior investigators of this study.