



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAL**

**DETECÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM
AMOSTRAS TECIDUAIS DE TUMORES DA MAMA**

FRANCIANNE SILVA ROCHA

**Belém-Pará
2010**

FRANCIANNE SILVA ROCHA

**DETECÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM
AMOSTRAS TECIDUAIS DE TUMORES DA MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais, área de concentração Clínica das Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma.

**Belém-Pará
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) – Biblioteca do
Núcleo de Medicina Tropical / UFPA, Belém-PA**

Rocha, Francianne Silva.

Detecção molecular do papilomavirus humano (HPV) em amostras teciduais de tumores da mama / Francianne Silva Rocha; orientador, Juarez Antônio Simões Quaresma. – 2010

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2010.

1. Tumores. 2. Mamas-doenças. 3. Papilomavírus. I. Quaresma, Juarez Antônio Simões, orient. II. Título.

CDD: 22. ed.616.994

FRANCIANNE SILVA ROCHA
DETECÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM
AMOSTRAS TECIDUAIS DE TUMORES DA MAMA.

Dissertação apresentada à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Clínica das Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma- Orientador: Núcleo de Medicina Tropical, UFPA.

Profa. Dra. Nara Botelho de Brito – Membro – Instituto de Ciências da Saúde, UFPA.

Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Souza– Membro - Núcleo de Medicina Tropical, UFPA.

Profa. Dra. Denise da Silva Pinto- Membro-Instituto de Ciências da Saúde, UFPA

Prof. Dra. Luisa Caricio Martins – Suplente - Núcleo de Medicina Tropical, UFPA

Belém-PA
2010

À minha família: meu filho André Luiz, meu marido Paulo Junior, meus pais Juary e Yvany, meus irmãos Sérgio, Rose e Nando, minha cunhada Nazeth, meus queridos sobrinhos pela paciência em todos os momentos, pelo apoio e carinho com que relevaram minhas ausências.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo agradeço a DEUS pela assistência e amparo.

Aos meus Orientadores Prof. Dr. Juarez Quaresma e a Profa. Dra. Hellen Fuzii no encaminhamento seguro.

Aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa.

Ao Núcleo de Medicina Tropical – UFPA pela oportunidade de engrandecimento.

A todos os colegas médicos em especial aos Dr. Rui Azevedo e Dr. Antônio Pinheiro e outros colaboradores que tornaram possível a realização desta pesquisa.

RESUMO

A neoplasia maligna da mama é uma das principais causa de mortalidade feminina, considerada como problema de saúde pública. Neste trabalho pesquisamos a presença do Papilomavírus Humano (HPV) nos tumores mamários benignos e malignos e em amostras de tecido mamário normal. Foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção molecular do DNA HPV em 63 pacientes, assim distribuídas: 28 tumores malignos, 17 tumores benignos e 18 amostras de tecido retro areolar de mamas normais. Os nossos resultados revelaram positividade para a seqüência do DNA HPV em 11 amostras, todas pertencentes às portadoras de tumores malignos: 17,4% de todas as amostras e 39,2% dos tumores malignos. Todos os tumores positivos revelaram DNA HPV para os tipos oncogênicos 16 e/ou 18, não foi detectado DNA HPV 06 e 11. Os resultados demonstraram elevada positividade para os receptores hormonais nas amostras positivas examinadas e apresentaram um seguimento com prevalência de eventos desfavoráveis como recidivas loco-regionais, metástases e óbito nas portadoras de DNA HPV. Os achados ratificam os dados encontrados na literatura, mostrando uma possível participação deste vírus no desenvolvimento do câncer de mama e possível contribuição desfavorável na evolução clínica.

Palavras-chave: tumores de mama. Papilomavírus Humano. PCR.

ABSTRACT

The malignant neoplasm of breast is a major cause of female mortality, considered as a public health problem. In this work researched the presence of human papillomavirus (HPV) in benign and malignant breast tumors and normal breast tissue samples. Was used the technique of Polymerase chain reaction (PCR) for HPV DNA molecular detection in 63 patients, thus distributed: 28 malignant and 17 benign tumors and 18 are samples of normal breast. Our results showed positivity for HPV DNA sequence in 11 samples, all belonging to the bearers of malignant tumors: 17.4% of all samples and 39.2% of malignant tumors. All positive HPV DNA showed tumors for oncogênicos types 16 and/or 18, was not detected HPV 6 and 11 DNA. The results demonstrated high positivity to the hormonal receptors in positive samples examined and presented a follow-up with prevalence of adverse events as relapse loco-regional metastases and death in with HPV DNA. Finds ratify the data found in the literature, showing a possible participation of this virus in the development of breast cancer and possible unfavorable contribution in clinical evolution.

Keywords: breast tumors. human papillomavirus. PCR.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo celular.....	24
Figura 2- Tumor maligno e drenagem linfática.....	27
Figura 3- Carcinoma in situ.....	29
Figura 4 - Carcinoma invasor da mama.....	29
Figura 5- Estimativa de CA de mama e colo do útero no estado do PA....	38
Figura 6 - Fatores de risco para câncer de mama.....	41
Figura 7 - Mastectomia radical Pattey com radio dermite.....	47
Figura 8- programação de tratamento conservador e resultado pós-operatório.....	48
Figura 9- Relação entre os genes do HPV e suas funções.....	51
Figura 10- Organização Genômica do HPV.....	53
Figura 11-Replicação Viral do HPV.....	55
Figura 12- Faixa etária portadoras de tumor e mamas normais.....	76
Figura 13- Faixa etária portadoras de HPV e mamas normais.....	76
Figura 14- Paridade e câncer de mama... ..	77
Tabela 1- Estimativa de taxa bruta de Câncer feminino no Brasil.....	37
Tabela 3- Seqüência de primers de HPV.....	74
Tabela 4- Principais resultados da pesquisa.....	80
Tabela 5- Representação de tumores com DNA HPV	81

LISTA DE SIGLAS

ATM	Mutado em A-T. Gene com papel na divisão celular e reparo do DNA
BRCA1	Gene associado à pré disposição genética ao câncer de mama
BRCA2	Gene associado à pré disposição genética ao câncer de mama e ovário
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E	Região precoce do papillomavírus humano
E6	Oncoproteína do papillomavírus humano
E7	Oncoproteína do papillomavírus humano
E2F	Fator de transcrição
EGF	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HER1	Receptor de fator de crescimento
EVB	Vírus Epstein Barr
HER2	Receptor de fator crescimento, gene que favorece a divisão e proliferação celular
HER3	Receptor de fator de crescimento
HER4	Receptor de fator de crescimento
HERVs	Retrovírus Endógeno Humano
HPV	Papilomavírus Humano
HPV 16	Papilomavírus Humano Subtipo 16
HPV 18	Papilomavírus Humano Subtipo 18
HPV 33	Papilomavírus Humano Subtipo 33
HR	Receptores Hormonais
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humano
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IGF	Fator de Crescimento Insulina like

KSHV	Vírus Associado ao Sarcoma de Kaposi
L	Região Tardia do Papilomavírus Humano
MMTV	Vírus do Tumor Mamário Murino
NF K β	Kappa- beta- complexo protéico que atua como fator de transcrição
ORF	Open Reading Frame
PCR	Reação em cadeia polimerase
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
P110	Subunidade catalítica da PIK3CA
P53	Proteína supressora tumoral
PCR	Reação em cadeia polimerase
P110	Subunidade Catalítica da PIK3CA
P53	Proteína supressora tumoral
PIK3CA	Gene responsável pela proliferação e sobrevivência celular, possui duas subunidades: reguladora kDa 85 e catalítica p110
PRb	Proteína Retinoblastoma
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
SBM	Sociedade Brasileira de Mastologia
TGF	Fator de Crescimento Transformador
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE SIGLAS

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	NEOPLASIAS MAMARIAS.....	18
2.1.1	Definição.....	18
2.1.1.2	Etiologia.....	19
2.1.1.3	Biologia.....	25
2.1.1.4	Epidemiologia.....	36
2.1.1.5	Fatores de risco.....	39
2.1.1.6	Diagnóstico clínico e complementar.....	42
2.1.1.7	Tratamento.....	46
2.2	PAPILOMA VÍRUS HUMANO.....	50
2.2.1	Definição e classificação taxonômica.....	50
2.2.2	Organização genômica.....	50
2.2.3	Ciclo biológico.....	54
2.2.4	Epidemiologia.....	59
2.2.5	Relação do Papiloma Vírus Humano e Cânceres Humanos.....	60
3	OBJETIVOS.....	66
3.1	OBJETIVO GERAL.....	66
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	66
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
4.1	LOCAL DE ESTUDO.....	67
4.2	CASUÍSTICA.....	68

4.2.1	Critérios de inclusão e exclusão.....	68
4.2.1.1	Critérios de Inclusão.....	68
4.2.1.2	Critérios de Exclusão.....	68
4.2.2	Obtenção do material biológico.....	69
4.3	M ÉTODO DE DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV.....	69
4.3.1	PCR 01.....	72
4.3.2	PCR 02.....	72
5	RESULTADOS.....	75
6	DISCUSSÃO.....	83
7	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICES.....	96

1 INTRODUÇÃO

A mama é uma glândula apócrina, modificada, que sofre influências dos hormônios femininos e pode ser sede de patologias infecciosas, inflamatórias e tumorais. Os processos tumorais, benignos e malignos, pela sua grande relevância biológica, são os mais freqüentemente estudados, destacando-se dentre eles as neoplasias malignas, pela grande incidência e mortalidade. Acredita-se que a neoplasia maligna da mama é um dos mais importantes problemas de saúde pública em países desenvolvidos, ocupando os primeiros lugares como causa de mortalidade feminina (LÉON, 2009).

O desenvolvimento tumoral se manifesta por etapas que descrevem o processo de formação da neoplasia e, didaticamente, se classificam em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na etapa da iniciação, observamos mutação e erros de reparo do DNA, ativação de protooncogenes, inibição de genes supressores tumorais, mais notadamente o gene p53 e retinoblastoma, envolvidos nos processos de apoptose e parada do ciclo celular e ainda podemos evidenciar a ação de agentes físicos, químicos e vírus oncogênicos. Na etapa da promoção, ocorrem modificações na expressão do genoma, indução do aumento da proliferação celular e hiperplasia. Durante a etapa da progressão, as múltiplas alterações genéticas immortalizam a célula danificada e as ações virais podem promover danos adicionais (GOMES CARNEIRO, 1997).

O desenvolvimento da doença é um processo que ocorre em múltiplas fases e que, provavelmente, é influenciado por diferentes fatores em cada fase do

desenvolvimento. Acredita-se que o desenvolvimento da neoplasia da mama é baseado em fatores de risco, atribuídos a agentes não infecciosos, como genes humanos (ação dos protooncogenes e genes supressores tumorais) e fatores epigenéticos. No entanto, evidências têm surgido, ligando agentes infecciosos a essa doença (NACKERDIEN, 2008).

Dentre os agentes infecciosos mais comumente associados às neoplasias em humanos, encontramos certas classes de vírus, chamados vírus oncogênicos. E agora sabemos baseados em evidências científicas, que pelo menos seis vírus humano como Vírus Epstein Barr (EBV), Vírus da Hepatite B (VHB), Vírus da Hepatite C (VHC), Papilomavírus Humano (HPV), Vírus Linfotrópico de células T Humanas (HTLV) e o Vírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV), contribuem com 10 a 15% dos cânceres de todo o mundo (MARTIN; GUTKIND, 2008).

A correlação entre o câncer de mama e o HPV tem sido objeto de alguns estudos, assim como do vírus Epstein Barr (EBV) e do equivalente humano do vírus do tumor mamário murino (MMTV), embora a relação da etiologia tumoral e o vírus ainda não estejam bem evidenciados, parece que eles podem ser responsáveis por uma das etapas, de uma série delas, que requerem o desenvolvimento de um câncer (AMARANTE; WATANABE, 2009).

A inserção casual de um genoma proviral perto de um proto-oncogene pode contribuir para a neoplasia. A tumorigênese mamária pelo vírus de tumor mamário em murino (MTTV) é mediada pela ativação insercional de pelo menos um dentre vários genes por seqüências intensificadoras na seqüência de repetição terminal

longa proviral de MTTV. O gene *int-1* foi identificado adjacente a um sítio de integração proviral de MTTV, sua expressão é restrita a tumores e não é encontrada em tecidos normais. E este oncogene causa transformação morfológica de células epiteliais mamárias cultivadas, mas é incapaz de transformar fibroblastos in vitro. Este modelo inspirou a possível etiologia viral do câncer de mama (BLAND; COPELAND, 1994).

Dentre os vírus considerados como oncogênicos, evidencia-se o Papilomavírus Humano (HPV) encontrado em mais de 85% dos cânceres cervicais e também associados a tumores genitais e extragenitais. A infecção pelo HPV, especialmente pelos tipos oncogênicos, 16 e 18, é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (CHENG, 2005).

O câncer de mama tem sido associado à presença de HPV por alguns autores (KAN, 2005; HENG, 2009). Alguns trabalhos têm demonstrado a presença de DNA viral de subtipos de alto risco em tecido areolar e tecido tumoral das portadoras de câncer de mama (DE VILLIERS et al. 2004). A suspeita de que o HPV possa ter um papel no câncer de mama humano é baseada na identificação do HPV em tumores mamários humanos e na imortalização de células do câncer de mama humano pelo HPV 16 e 18, considerados como os tipos de alto risco (KAN, 2005). Demonstrou-se a presença do HPV de alto risco nas células de espécimes de câncer de mama e que as características oncogênicas do HPV associado ao câncer de mama são muito semelhantes ao HPV associado ao câncer cervical (HENG, 2009).

O aumento progressivo na incidência do câncer de mama em todo o mundo e, como consequência, a elevada mortalidade associada, constitui importante problema de saúde pública e têm movimentado grande soma de investimentos em pesquisas e estudos relacionados, ressaltando a relevância da sua etiologia multifatorial e complexidade biológica, geralmente associada a fatores genéticos e não infecciosos. Além disso, possui grande heterogeneidade no comportamento clínico. Isto significa que a total compreensão da evolução das neoplasias mamárias ainda pode ser realidade algo distante.

Na região Norte, o estado do Pará apresenta elevada incidência do Papilomavírus Humano associado principalmente aos cânceres de colo uterino. Já existem vários trabalhos na literatura, tentando correlacioná-los aos tumores mamários, portanto um estudo regionalizado envolvendo pesquisa e detecção do vírus HPV e tipagem dos subtipos de maior importância em tumores mamários malignos, benignos e amostras de mamas normais nesta população ainda não estudada relacionando um estudo estatístico dos achados seria de grande importância para o melhor conhecimento das características da neoplasia de mama no nosso estado.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. NEOPLASIA MAMÁRIA

2.1.1 Definição

As mamas são estruturas complexas consideradas como glândulas sudoríparas especializadas. Apresentam comportamento de órgãos efetores controlados pelo mesmo eixo neuroendócrino que regula o sistema reprodutor. Encontra-se dentro da fáscia superficial da parede torácica anterior e consistem em 15 a 20 lóbulos de tecido glandular do tipo tubuloalveolar, tecido conjuntivo fibroso conectando seus lobos e tecido gorduroso nos intervalos dos lóbulos. Esta glândula pode ser sede de diversas afecções inflamatórias, infecciosas e tumorais.

As neoplasias de mama podem apresentar características benignas ou malignas. Nos processos benignos, as formações tumorais são ordenadas e circunscritas e nas neoplasias malignas se caracterizam pelo desarranjo e infiltração. Os tumores podem ser de origem epitelial ou mista (epiteliais e conjuntivos). O câncer de mama é considerado do ponto de vista citológico como população homogênea de células malignas. Estes grupamentos celulares quase sempre se encontram como arranjos desordenados, contendo células atípicas com pleomorfismo, aumento de seu volume nuclear, cromatina grumosa, irregular e nucléolo proeminente. Além disto, é reconhecida como entidade heterogênea na apresentação clínica e no seu comportamento biológico.

É considerado como um dos tumores mais freqüentes entre as mulheres em todo o mundo. O Brasil apresenta estimativa para 2010 em torno de 49.240 novos casos. Também é uma das principais causas de mortalidade, apresentando 11.860 números de morte em 2008, e na população mundial uma taxa de sobrevivência média após 05 anos de 61%, segundo dados do INCA (2004).

2.1.1. 2. Etiologia

Acredita-se que não há uma única causa que possa ser considerada como fator primário para seu início. Existe a idéia da relevância de alterações genéticas pela observação de algumas evidências, como a predisposição familiar, presença de alterações cromossômicas em células tumorais e a ação oncogênica de muitas substâncias com potencial mutagênico (CHAGAS, 1997).

Vários caminhos foram propostos para determinação da etiologia tumoral mamária. Com o modelo murino de tumorigênese, aventou-se a etiologia viral para o câncer de mama e as experiências visando encontrar tal agente focalizaram três áreas. Primeiramente seqüências genômicas humanas endógenas que possuem similaridade com MTTV foram identificadas, mas nenhum deles continha a seqüência proviral em extensão completa e não conseguiram identificá-los em tecidos normais e malignos.

Em um segundo caminho, focalizaram-se grupos geográficos ou étnicos cuja incidência de câncer de mama fosse mais alta ou com características incomuns, como nas mulheres tunisianas que apresentam concentração de casos agressivos e

rapidamente fatais. Então, avaliando o histórico de concentração geográfica e as características clínicas nesta mesma população, foi proposta a existência de um agente etiológico exclusivo. Além destas, as mulheres parses em Bombaim- Índia têm a mais alta incidência de câncer de mama dentre os muitos grupos étnicos daquela cidade. Durante a década de 70, vários estudos coletaram evidências de partículas semelhantes a retrovírus no leite das mulheres parses, mas naquela ocasião, não conseguiram isolar vírus em nenhum tecido mamário humano. As pesquisas sobre a possível etiologia viral do câncer de mama foram baseadas no modelo murino de tumorigênese mamária induzida por retrovírus. Depois desta pesquisa, se mostrou que a transferência de DNA de células tumorais para células normais poderia conferir um fenótipo tumorigênico e deu origem a uma nova área de pesquisa em oncogenes (BLAND; COPELAND, 1994).

O papel dos oncogenes foi abordado através de uma terceira pesquisa, a transferência de genes clonados. A transfecção de genes transformadores virais ou celulares, individualmente ou combinados, foi usada para alterar o fenótipo de células malignas de mama hormônio-dependente. Weinberg (1983) ilustrou as funções complementares dos oncogenes na transformação in vitro, as células de câncer humano MCF-7 são estrogênio dependentes, pois necessitam de estrogênio para o crescimento in vitro. Estas células secretam fatores de crescimento peptídicos, incluindo fator de crescimento α derivado de tumor (TGF- α), fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator estimulador de colônias de células epiteliais, fator de crescimento derivado da mama, fator autócrino derivado de motilidade.

Ao efetuar a infusão destes fatores em murino, em vez de estrogênio, os implantes de células MCF-7 crescem para tumores de tamanho limitado e depois regredem. Foi realizado estudo por Kasid (1985) tentando esclarecer se a hormônio-independência era fenotipicamente semelhante ao estado hormônio induzido, então, construíram uma linhagem celular MCF-7 hormônio-independente pela transfecção com clone de DNA *v-ras*. O gene *ras* foi escolhido, pois ele é ativado por mutações pontuais em muitos carcinomas humanos e pela sua função transformadora de segunda fase nos modelos de oncogênese em duas etapas. As células resultantes do MCF-7 *ras* expressaram a proteína mutante p21, tinham tempo de duplicação mais curto do que as células MCF-7 progenitoras e eram resistentes aos efeitos inibidores do crescimento antiestrogênicos. Acredita-se que a introdução de oncogenes específicos dentro de células mamárias primárias cultivadas possa resultar a sua imortalização (BLAND; COPELAND, 1994).

Os proto- oncogenes são os homólogos celulares dos genes transduzidos ou ativados pelos retro-vírus de transformação. Vários proto-oncogenes foram identificados e anteriormente catalogados em 05 categorias gerais: (1) fatores de crescimento (*sis* e *int-2*), (2) receptores para fatores de crescimento e hormônios (*erbB*, *fms*, *erbA*), (3) tirosina quinase (*src*) e serina quinase (*mos*) intracelulares, (4) oncogenes núcleo-associado (*fos*, *myb*, *jun*), (5) moléculas semelhantes à proteína G (*ras*). Descobriu-se que retrovírus transformando-se agudamente era capaz de transduzir genes *onc* dos genomas das suas células hospedeiras e isto levou a identificação e à caracterização dos correspondentes proto-oncogenes celulares. Conhecemos o papel fisiológico de apenas alguns proto-oncogenes, tais como o gene *c-sis*, que codifica a cadeia B polipeptídica do fator de crescimento derivado

das plaquetas (PDGF) e os genes *c-erbB* e *c-fms* cuja função é codificar para o receptor ao fator de crescimento epidérmico (EGFR). Estes proto-oncogenes podem afetar o crescimento e a diferenciação celular e podem contribuir para o estabelecimento do fenótipo maligno. A ativação de proto-oncogenes celulares para oncogenes é considerada muito importante na carcinogênese por indução química e irradiação (BLAND; COPELAND, 1994).

A ativação dos oncogenes pode ocorrer tanto na fase de iniciação quanto na fase de progressão tumoral. Esta ativação dos oncogenes ocorre por amplificação gênica, rearranjos cromossômicos estruturais, mutações de ponto nas seqüências reguladoras ou codificadoras e, ainda, por inserção viral. As translocações e mutações podem ocorrer como eventos iniciais ou durante a progressão tumoral, enquanto a amplificação geralmente ocorre durante a progressão. Os oncogenes codificam proteínas responsáveis pelo controle da proliferação, diferenciação e apoptose celular. Atualmente considera-se que os produtos dos oncogenes podem ser classificados em seis grandes grupos: fatores de transcrição, remodeladores da cromatina, fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento, transdutores de sinais e reguladores do mecanismo da apoptose (SOARES, 2009).

A oncogênese pode ser desencadeada por diversos fatores que incluem a ativação de oncogenes e a inibição de genes supressores tumorais e apresenta algumas etapas que envolvem mudanças genéticas. Quanto mais tempo uma célula viver, maior será sua chance de adquirir mutações vantajosas em termos de crescimento e diferenciação. Sabemos que todas as células carregam programas de controle de seu tempo de vida e, para se tornar neoplásica, a célula deve sofrer uma

ou mais alterações no seu genoma, usualmente na forma de mutações nos genes envolvidos no ciclo celular, o que leva a um relaxamento dos mecanismos de controle do crescimento e divisão. Células nas quais os mecanismos de controle foram alterados têm maior chance de desenvolver novas anormalidades genéticas, isto é, se tornarem instáveis. A instabilidade do genoma tem sido considerada como importante fator na formação e progressão da neoplasia (WARD, 2002).

A compreensão do funcionamento do ciclo celular e dos oncogenes norteia o entendimento do desenvolvimento tumoral (figura 1). O ciclo celular é composto de quatro estágios: na fase G1 (gap 1 = interfase), a célula aumenta de tamanho e prepara-se para copiar seu DNA. A cópia (replicação) ocorre na fase seguinte, chamada de S (síntese) e permite que a célula duplique seus cromossomos. Depois de replicados os cromossomos, inicia-se a fase G2 (gap 02), durante a qual a célula prepara-se para a fase M (mitose) na qual a célula divide-se ao meio, para produzir duas células-filhas, com igual número de cromossomos. As células-filhas entram em fase G1 e podem reiniciar o ciclo celular, ou parar o ciclo temporária ou definitivamente (RIVOIRE, 2001).

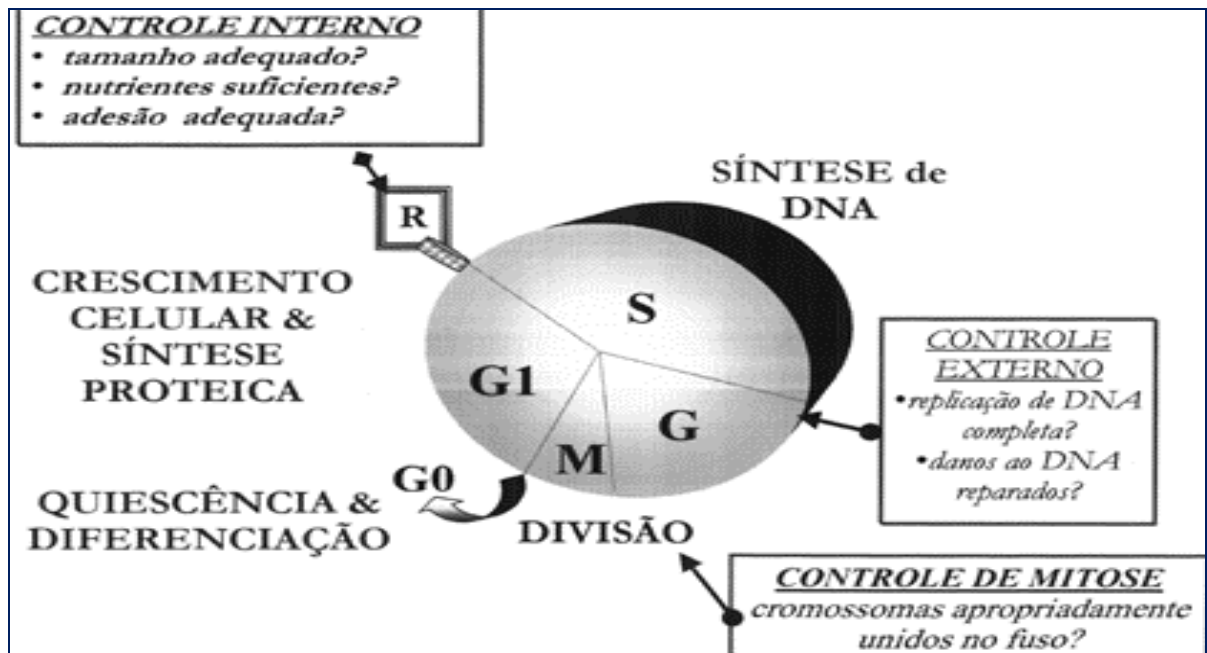


Figura 1- Pontos de controle do ciclo celular. O ciclo celular possui fases ordenadas, em G0 a célula encontra-se diferenciada, em G1 aumenta de tamanho e prepara a síntese proteica, nesta fase a célula está sensível à influências ambientais, se não forem favoráveis à divisão se detém. Se ultrapassar este ponto de restrição a divisão irá ocorrer independente das condições ambientais. Na fase G2 existe outro ponto de controle importante para avaliação do DNA replicado e antes da fase da mitose existe a checagem de anormalidades na divisão dos cromossomos (WARD, 2002).

Algumas proteínas inibidoras podem parar a progressão deste ciclo. Podemos citar a p15 e p16, que atuam bloqueando componentes importantes para a continuação do ciclo celular, como CDK (cyclin-dependent kinases) e ciclinas, impedindo o avanço do ciclo da fase G1 para S. Existem mecanismos de controle da divisão celular, um destes mecanismos de controle é a morte celular programada, chamada apoptose. Acredita-se que o desenvolvimento de células tumorais ocorre também por supressão deste mecanismo. A proteína p53, entre outras funções, auxilia no início da apoptose; sua inativação diminui a chance de células geneticamente mutadas serem eliminadas, iniciando um processo carcinogênico.

Outro mecanismo de controle da divisão celular é um mecanismo de contagem do número, limitado, de vezes que determinada célula se reproduz. Neste mecanismo, as pontas dos cromossomos (telômeros) marcam o número de divisões, e no momento apropriado iniciam senescência e morte (WARD, 2002).

2.1.1.3 Biologia

O avanço da biologia molecular tem proporcionado melhor entendimento sobre os mecanismos que regulam a proliferação e diferenciação celular e o desenvolvimento de neoplasias. Considerando a complexidade biológica das neoplasias malignas e a possibilidade de que a presença de fatores ainda não conhecidos possa influenciar direta ou indiretamente na formação e no desenvolvimento tumoral, somos levados a considerar que possa haver outras contribuições à etiopatogenia do câncer de mama. Rauch (2009) realizou estudo demonstrando que a inflamação crônica de longa data está associada com uma gama de neoplasias malignas, sendo agora amplamente aceita como fator de risco para desenvolvimento do câncer e estando implicada como promotora de uma variedade de cânceres. Outros estudos com retrovírus transformando seus oncogenes e os múltiplos mecanismos criados pelo vírus para eclodir o crescimento e a função anti-apoptótica de genes supressores tumorais têm proporcionado fundamentação para a compreensão atual da biologia do câncer (MARTIN; GUTKIND, 2008).

O processo de malignização se traduz pela ocorrência de várias mutações indesejadas que induzem à transformação de células normais pela ativação de

proto-oncogenes ou à inativação de genes supressores ou vias anti-oncogênicas (ZHANG, 2010). Estas duas classes de genes, pequenas em relação ao total de genes, têm papel chave no desenvolvimento do câncer. Em suas configurações normais, elas dirigem o ciclo celular em uma intrincada seqüência de eventos, pelos quais as células crescem e se dividem. Proto-oncogenes estimulam, enquanto genes supressores inibem os processos de divisão celular (WEINBERG, 1996).

Na neoplasia de mama, o período crítico de oncogênese parece corresponder ao intervalo entre a menarca e a primeira gestação a termo, pois o lóbulo mamário, na menarca, encontra-se em amplo processo de divisão celular até o final da adolescência. Quando a proliferação é intensa, a célula fica mais susceptível a agentes carcinogênicos, podendo resultar em mutações e transformações malignas. O desenvolvimento tumoral é lento, expressando-se com maior freqüência a partir dos 35 anos, sendo cada vez mais freqüente com o progredir da idade (BARROS; NAZÁRIO, 1994; BERGMANN, 2000).

A história natural do câncer de mama demonstra uma fase clínica mais longa que a da maioria dos outros tumores, com padrão de crescimento e disseminação mais heterogênea. Da mesma forma, parece que sua fase pré-clínica (período compreendido entre o aparecimento da primeira célula maligna e o aparecimento de um tumor com tamanho ou características adequadas ao diagnóstico clínico) também é longa na maioria dos casos. Depois do surgimento da primeira célula maligna, a velocidade de crescimento do tumor fica na dependência do tempo de duplicação de suas células. Cada célula cresce até um determinado ponto, realiza

uma divisão binária, ocorrendo duplicação do seu material genético: ciclo celular (CHAGAS, 1997; BERGMANN, 2000).

A partir da instalação do tumor primário de mama, ocorrerá a sua propagação às estruturas vizinhas e à distância, podendo esta ser por via direta, atingindo seqüencialmente os ductos, parênquima mamário, podendo progredir até o tecido perimamário, culminando com a invasão de tecidos adjacentes; via linfática, que ocorre concomitante com a disseminação sanguínea, através da embolização das células neoplásicas ao serem veiculadas pela linfa (figura 2); e por via vascular, originando-se a partir de pequenas veias intramamárias (CHAGAS, 1997).

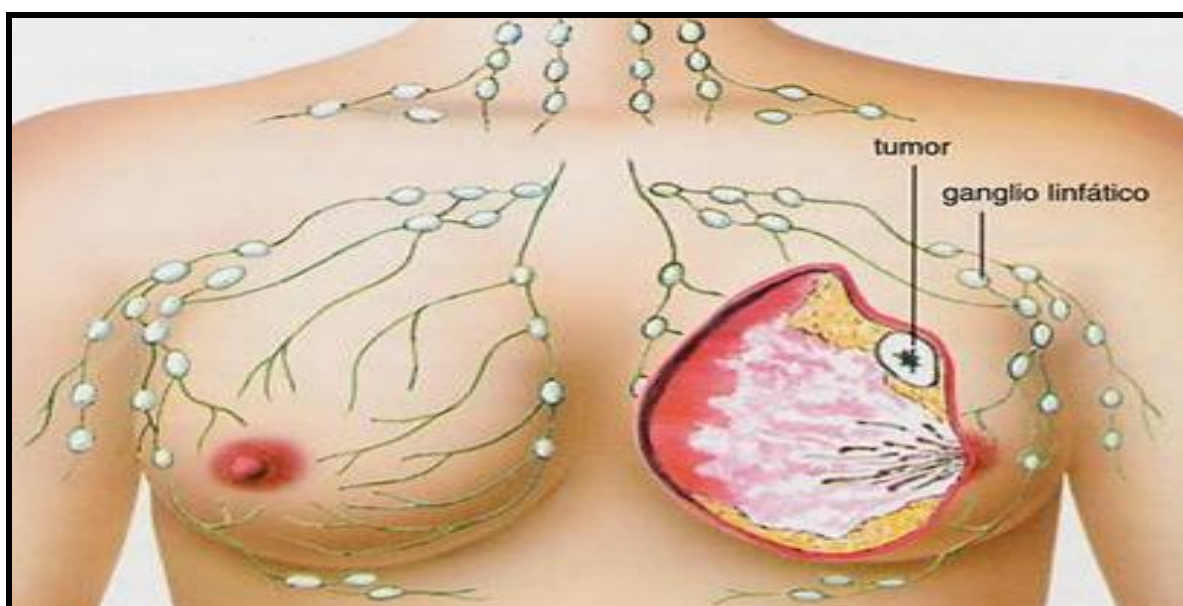


Figura 2- Representação de tumor maligno mamário e sua propagação linfática.
Fonte: online: cbfisio, 2005.

Nas neoplasias em geral, o reconhecimento de lesões morfológicamente intra-epiteliais focais associadas ao desenvolvimento eventual de câncer invasivo

tem sido uma condição para o diagnóstico do pré- câncer. Empiricamente, pré-câncer está associado com um contínuo morfológico de atipia para displasia e para neoplasia invasiva. Estas lesões são usadas como indicadores precoces de câncer e seu reconhecimento tem dramática redução da mortalidade nos cânceres de cólon, cérvix uterina e mama. Esta progressão tem sido modelada como um processo linear e algumas evidências moleculares apóiam este modelo (CARDIFF; BOROWSKY, 2009).

No curso natural das neoplasias acredita-se haver evolução de células hiperplásicas que poderão progredir para células hiperplásicas atípicas e, então, com o agravamento e intensificação das alterações, poderá ocorrer a transformação para carcinomas in situ (figura 3) e então posteriormente para carcinomas invasivos (figura 4). No entanto, na carcinogênese mamária, observamos que uma parte dos carcinomas infiltrativos ou invasivos evolui após longo período de lesões benignas pré-existentes, passando por lesões precursoras pré-malignas, carcinoma in situ e carcinomas micro-invasivos, no entanto outra parte desses tumores parece não seguir estas etapas e formar desde o início carcinomas in situ ou invasores com potencial ou não para metastatização (BUZAID; BARROS, 2007).

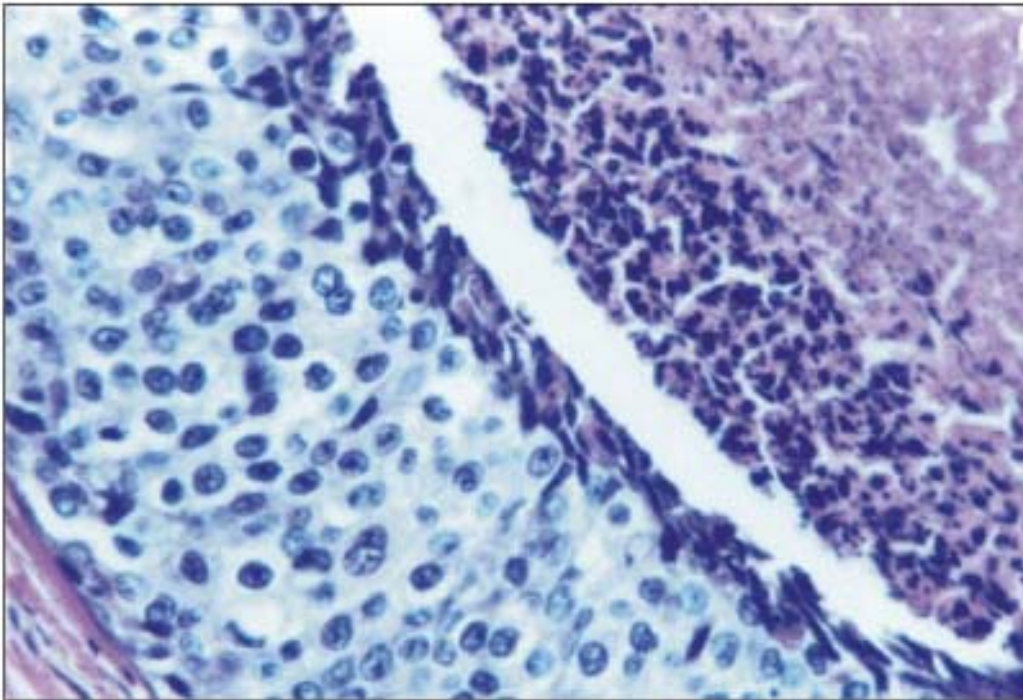


Figura 3 - Carcinoma *in situ* do tipo comedo, alto grau nuclear (hematoxilina e eosina – 400x) Fonte: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-72032006001200006>

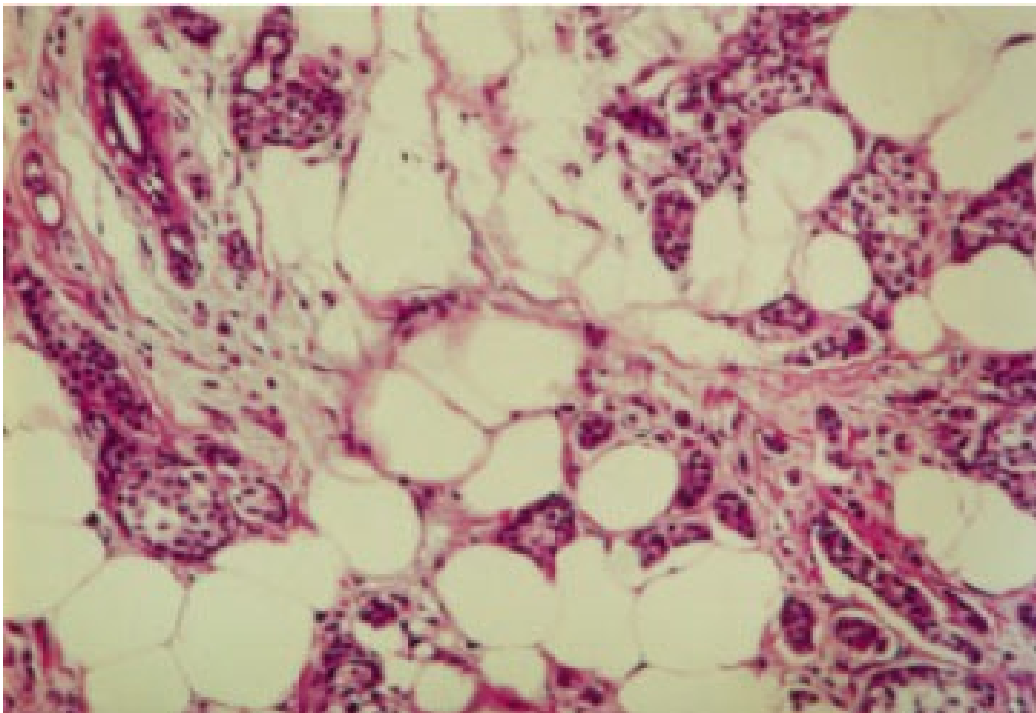


Figura 4 Carcinoma invasor da mama (hematoxilina e eosina – 400x)
Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032000000500009

Durante a última década, houve grande desenvolvimento no entendimento molecular do câncer de mama, demonstrando que esta neoplasia não é uma simples doença com uma simples via de tumorigênese, mas uma via heterogênea. A identificação da expressão gênica tem se transformado na chave do entendimento da diversidade biológica dos tumores mamários (VIVANCO, 2010).

Formas agressivas de câncer são freqüentemente definidas pelas alterações cromossômicas. Na maioria dos casos, a causa ou contribuição dos componentes genéticos ainda é pobremente entendida (ZHANG, 2009).

Os mecanismos de reparo do DNA são importantes peças para a manutenção da integridade do DNA e proteção contra seus danos. A desregulação desses mecanismos está associada com o desenvolvimento de câncer assim como tumores que apresentam mutação do BRCA1 e BRCA2. Recentes achados biológicos sugerem que tumores nos quais as vias de reparo são deficientes apresentam também inibição de outras vias de reparo e que poderiam agir sinergicamente (AMIR, 2010).

O primeiro passo no reconhecimento da heterogeneidade do câncer de mama foi a demonstração da presença de receptores hormonais (HR) em aproximadamente dois terços dos espécimes de câncer de mama. Este achado estabeleceu a primeira classificação em dois subtipos claros: HR positivos e HR negativos e que depois foi seguido pela demonstração de muitas outras características. A presença do gene Her-2-neu em 20% dos cânceres é provavelmente a mais importante delas, mas não a única (MARTIN, 2007).

Há uma forte evidência de que a influência dos hormônios ovarianos tem ação promotora na patogênese da neoplasia mamária, acreditando-se que eles afetam o risco de câncer de mama ao aumentar a atividade mitótica. O estrogênio sozinho induz a alguma divisão celular, mas, associado à progesterona (o que ocorre durante a fase lútea do ciclo menstrual), a divisão celular é aumentada, levando a um risco maior de desenvolvimento do câncer de mama (KELSEY; GAMMON, 2001).

O efeito paradoxal dos hormônios ovarianos tanto para prevenção quanto para a promoção da neoplasia de mama tem sido debatido há mais de 30 anos. Estudos genéticos demonstram que hormônios ovarianos atuam através da NF-kappa-beta para estimular a proliferação ductal. Considera-se que a proteína p53 (gene supressor tumoral) desempenha um papel central na resistência a tumorigênese mamária. Estudos transcricionais, agora, sugerem que hormônios ovarianos estimulam uma constelação de genes que interagem com NF-kappa-beta e com p53 para arbitrar demandas competidoras de proliferação e vigilância (JERRY, 2010).

Uma grande proporção de cânceres de mama expressa receptores alfa de estrogênios e dependem dos estrogênios para sua proliferação e sobrevivência. A proteína p53 é importante mediadora de efeitos anti-proliferativos e apoptóticos e cerca de 20-30% dos tumores mamários apresentam a mutação do p53. Acredita-se que estas mutações estão relacionadas com pior sobrevivência e pobre resposta a vários tipos de tratamentos quimioterápicos. Usando células de câncer de mama hormônio dependentes e diferentes status de p53, foi demonstrado que os

estrogênios, através dos receptores alfa, influenciam os níveis de p53 e sua atividade (FERNANDEZ-CUESTA, 2010).

As alterações dos genes p53, BRCA1, ATM, PIK3CA e HER2 estão envolvidos em vários aspectos da carcinogênese mamária. Dentre estes, somente a mutação do p53 mostra significância, embora não independente, no efeito negativo da sobrevida (BOZHANOV, 2010). Glândulas mamárias com p53 deficiente exibem evidências de um epitélio em transição epitélio mesenquimal e estes dados mostram a importância do sinergismo entre o estrógeno e a insuficiência do p53 em determinar propriedades básicas da carcinogênese em tecidos hormoniodependentes como a mama e o trato reprodutor (SHAY, 2008).

O desenvolvimento do câncer depende do comportamento biológico de clones mutados. A maioria das células mutadas é eliminada pelo nosso sistema imunológico, no entanto outras alcançam a progressão tumoral, algumas à leve invasão vascular eclodem como metástases loco-regionais ou à distância, assim como também existem células que caem na circulação, mas não conseguem desenvolver metástase ativa (LI 2007; BARROS, 1994; BUZAID, 2007).

A reação imunológica se inicia com a resposta imune inata do organismo. Em contato com células mutadas são acionados os macrófagos, neutrófilos e as células NK (natural killer), que são linfócitos capazes de reconhecer alterações de histocompatibilidade das células neoplásicas, secretando, então, citocinas como as interleucinas e o interferon (ROSA, 2006; BARROS, 1994; BUZAID, 2007).

Segue-se a esta, a resposta imune adaptativa, onde as células dendríticas apresentam os antígenos tumorais aos linfócitos T que agem por ação citotóxica direta (linfócitos T citotóxicos – CTL) ou através das secreções de citocinas. Os linfócitos B atuam na formação de anticorpos. Os CTLs destroem as células-alvo após o reconhecimento de peptídeos antigênicos apresentados pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I (MHC-I). Estes peptídeos são provenientes de antígenos tumorais que as células neoplásicas produzem, são degradados no citosol e apresentados em sua superfície citoplasmática, acopladas às moléculas de MHC-I. Para este reconhecimento, é necessária a participação das células apresentadoras de antígenos (APC), co-estimulando a resposta celular. Vindo de monócitos, as células dendríticas expressam moléculas de classe II do Complexo de Histocompatibilidade (MHC), que apresentam os antígenos capturados às células T auxiliares. As células dendríticas têm grande poder de capturar e apresentar os antígenos tumorais em suas superfícies e iniciarem uma resposta imune contra tumores de seus próprios hospedeiros. Atualmente, existem antígenos tumorais já identificados, como a ciclina B1 e o NYESO-1. A identificação destes antígenos tem contribuído para o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas contra câncer, é o caso de algumas vacinas contra o câncer de mama, utilizando o antígeno MUC1 (GIACOMINI, 2003).

Na investigação da neoplasia, várias abordagens estão sendo estudadas para desenvolver vacinas eficazes contra o câncer. O objetivo desta forma de terapia é ensinar o sistema imunológico do paciente a reconhecer os antígenos expressos nas células do tumor, mas não no tecido normal e tornarem-se capacitadas a reconhecer e destruir essas células anormais, deixando intacta a

célula normal. Em outras palavras, é uma tentativa para ensinar o sistema imunológico a reconhecer antígenos que escaparam da vigilância imunológica. O fenômeno de tolerância imunológica complica a compreensão de como o sistema imune pode realizar a defesa contra tumores espontâneos. A grande maioria das proteínas expressas pelos tumores é normal, tanto na estrutura quanto nos níveis de expressão. No entanto, dentre as mais 20.000 proteínas expressas por tumores, existem variantes que são produzidas em um ou outro tipo de câncer, em pequeno número e por algumas células tumorais, mas não estão presentes nos tecidos normais. Estas diferenças estruturais, mesmo sutis, são percebidas como estranhas e podem iniciar resposta imune antigênica vigorosa (ROSA, 2006).

A oncoproteína Ras é um antígeno tumoral gerado por substituições de aminoácidos nos resíduos 12, 13 ou 61 de quatro subtipos de proteínas Ras, presentes nas células normais. Elas exibem estruturas químicas alteradas, sendo que a seqüência de aminoácidos em uma oncoproteína Ras, que inclui um resíduo alterado, pode constituir um antígeno oligopeptídeo capaz de evocar resposta imune. Similarmente os alelos mutantes do gene supressor de tumores p53 podem apresentar substituições de aminoácidos que produzem versões alteradas desta proteína, sendo imunogênicas em quase 50% dos tumores humanos que expressam a proteína p53. Pela instabilidade genética das células tumorais e do grande número de ciclos celulares sucessivos pelos quais as linhagens celulares passam durante os vários estágios da progressão tumoral, alelos mutantes que codificam proteínas estruturalmente alteradas podem estar presentes com alta freqüência nos genomas destas células.

No entanto, algumas proteínas estruturalmente distintas podem ser ignoradas pelo sistema imune ou simplesmente toleradas por se apresentarem em níveis baixos demais para que haja ativação do sistema imune. Entretanto, se essas proteínas forem expressas em níveis muito elevados por células tumorais, as falhas na tolerância imunológica podem permitir o reconhecimento imunológico de tais células. Em muitos carcinomas de mama, o receptor HER2-Neu é freqüentemente expresso em níveis muito mais elevados que nos tecidos normais, então a reatividade imune pode ser ativada contra essa proteína. Alguns melanomas humanos expressam carboidratos de superfície, chamados gangliosídeos, que também são capazes de ativar resposta imune. A expressão de um destes carboidratos, GD3 é, algumas vezes, maior em células de melanoma que em relação aos seus precursores celulares normais, os melanócitos. Nesses casos, as proteínas superexpressas ou as moléculas de carboidratos levam à ativação do sistema imune.

Foi demonstrado que ocorrem alterações quantitativas e qualitativas na expressão de gangliosídeo durante a transformação oncogênica. Segundo Otake, (2005) alguns gangliosídeos têm sua expressão associada à progressão tumoral ou ocorre em consequência deste processo. Por exemplo, a inibição da expressão da GD3 diminui o crescimento em tumores experimentais, provavelmente pela modulação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) e consequente inibição da angiogênese. A transformação maligna parece ativar enzimas associadas com gangliosídeo, resultando em padrões alterados de expressão. Evidência da importância dos gangliosídeos como alvos potenciais de imunoterapia ativa tem sido sugerida pela observação que anticorpos monoclonais humanos

contra estes glicolípídeos induzem encolhimento da metástase de melanoma cutâneo humano. Assim, a superexpressão celular e presença de gangliosídeos no espaço intersticial podem desempenhar um papel central na regulação de crescimento celular, tolerância imunológica e na angiogênese tumoral e, assim, representaria um novo alvo para terapia contra o câncer (BITTON, 2002).

Existem indivíduos que apresentam deficiência no reconhecimento e na vigilância imunológica, não conseguindo ativar resposta celular imuno-competente para a supressão do crescimento tumoral e conseqüente desenvolvimento do câncer. Segundo Barros e Buzaid (2007) o estado nutricional, hábito e estilo de vida saudável e bem estar emocional contribuem para o bom funcionamento da maquinaria de defesa, não sendo incomum que tumores à distância apareçam após graves situações de estresse.

2.1.1. 4. Epidemiologia

Segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres. No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas. Acredita-se que a demora no diagnóstico, muitas vezes realizado já em estádios avançados, seja a responsável por esta realidade. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%. Relativamente raro antes dos 35 anos, acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Estudos estatísticos indicam progressão de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um

aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes. A mortalidade em 2008 foi de 11.860, sendo 11.735 mulheres e 125 homens. A estimativa de novos casos, no Brasil, para 2010 é de cerca de 49.240 (INCA 2010) (tabela 1).

Mulheres				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traquéia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
Subtotal	192.590	192,74	66.270	282,03
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
Todas as Neoplasias	253.030	253,23	79.070	336,52

Tabela 1- Estimativa das taxas brutas de incidência por 100.000 e número de novos casos de câncer em mulheres segundo localização primária no Brasil (INCA 2010).

No estado do Pará, o câncer de maior incidência é o de colo uterino na população feminina (figura 5), seguido de perto pela neoplasia maligna da mama, apresentando os casos agrupados na capital do estado que, no momento, é única cidade do estado capaz de oferecer tratamento oncológico especializado com as três principais terapêuticas: cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A neoplasia mamária ,ao contrário do câncer de colo uterino, está relacionada ao processo de industrialização, com risco de adoecimento associado a elevado status socioeconômico, além de outros fatores de risco clássicos descritos, tais como baixa paridade, idade precoce da menarca e tardia da menopausa, obesidade e consumo de álcool (GUERRA, 2005).

Localização Primária	Estimativa dos Casos Novos			
Neoplasia maligna	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	640	16,77	400	47,90
Colo do Útero	790	20,82	330	39,36

Figura 5- Estimativa das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer de mama e colo de útero, no Pará e capital (INCA 2010).

A neoplasia de mama é rara em homens, sendo a proporção de 01 homem para cada 100 mulheres. Em relação à idade, é mais rara entre os jovens, existindo um aumento crescente dos índices de incidência específicos por idade até a menopausa. As mulheres brancas apresentam um índice global maior de incidência de câncer de mama que as mulheres negras, sendo que esta diferença é significativa

somente após a menopausa. O status social elevado também tem sido mais associado à neoplasia de mama. As mulheres solteiras apresentam incidência menor de câncer de mama, quando comparadas com as casadas. O câncer de mama apresenta taxas bem distintas entre os países, sendo maiores nos Estados Unidos, Canadá, e norte da Europa (KELSEY; GAMMON, 2001).

A distribuição familiar no desenvolvimento da neoplasia de mama tem sido freqüentemente estudada, uma vez que o risco de vir a ter câncer de mama entre as mulheres com história familiar de mãe ou irmã com câncer de mama, diagnosticada principalmente quando na pré-menopausa, é mais elevado, quando comparado com o risco da população geral (BERGMANN, 2000).

2.1.1.5 Fatores de Risco

Todos os cânceres de mama têm origem genética. Acredita-se que 90%-95% deles sejam esporádicos (não-familiares) e decorram de mutações somáticas que ocorrem durante a vida, e que 5%-10% sejam hereditários (familiares) devido à herança de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres suscetibilidade ao câncer de mama (SBM, 2001). Baseado em pesquisas, observamos que algumas características e determinados perfis de comportamento apresentavam maior incidência para a neoplasia maligna da mama, assim foi possível catalogar e identificar estas características associadas ao risco de desenvolvimento tumoral (figura 6). Então, consideramos como fatores de risco para o câncer de mama: o sexo, a idade, a história familiar, história pregressa de câncer de mama, história reprodutiva e suscetibilidade genética. O sexo é o maior marcador

de risco, na proporção de 100 mulheres para cada 01 homem, devido à maior quantidade de tecido mamário e a maior exposição ao estrogênio endógeno. Dados indicam que com o aumento da faixa etária, há maior risco de apresentar câncer de mama e que 60%-70% dos casos novos de neoplasia maligna se incidem na faixa etária de 40 a 69 anos de idade (THULER, 2003).

A ocorrência de casos de câncer de mama em parentes de 1º grau (mãe, irmã ou filha) é considerada importante fator de risco e quando o evento for diagnosticado na fase da pré-menopausa estaria fortemente associado ao risco de apresentar a doença. As portadoras de mutação no BRCA1 e BRCA2 são pacientes que teriam maior suscetibilidade ao câncer de mama e ovário. Os genes BRCA1 e BRCA2 operam classicamente como genes supressores de tumor. Indivíduos com câncer de mama familiar herdam, em todas as células do corpo, uma mutação em um dos dois alelos do gene (mutação na linhagem germinativa). Conseqüentemente, todas as células do organismo passam a trabalhar com apenas uma cópia do gene em questão. Com o passar do tempo, outra alteração molecular ocorre, somaticamente, no alelo funcionante, e o fenótipo neoplásico se estabelece no órgão em que essa nova alteração ocorreu. Diferentemente do BRCA1, mutações em BRCA2 estão associadas a um risco aumentado para câncer de mama no sexo masculino. Homens que herdam mutações germinativas de BRCA2 possuem 6% de probabilidade de apresentar câncer de mama ao longo da vida que é aproximadamente um risco 100 vezes maior do que o esperado para a população normal (SBM, 2001).

Além destes, são considerados fatores de risco: exposição a radiações ionizantes, ingestão de gorduras saturadas, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gestação após os 30 anos de idade, uso indiscriminado de preparados hormonais, consumo de álcool e antecedentes familiares positivos. As maiores taxas de incidência ocorrem entre mulheres que não tiveram filhos, com situação profissional definida e vivendo em áreas com melhores condições socioeconômicas (MOLINA, 2003).

Fatores de risco para o câncer de mama ^(D)
<p>Risco muito elevado ($RR \geq 3.0$)</p> <p>Mãe ou irmã com câncer de mama na pré-menopausa Antecedente de hiperplasia epitelial atípica ou neoplasia lobular in situ Suscetibilidade genética comprovada (mutação de BRCA1-2)</p>
<p>Risco medianamente elevado ($1.5 \leq RR < 3.0$)</p> <p>Mãe ou irmã com câncer de mama na pós-menopausa Nuliparidade Antecedente de hiperplasia epitelial sem atipia ou macrocistos apócrinos</p>
<p>Risco pouco elevado ($1.0 \leq RR < 1.5$)</p> <p>Menarca precoce (≤ 12 anos) Menopausa tardia (≥ 55 anos) Primeira gestação de termo depois de 34 anos Obesidade Dieta gordurosa Sedentarismo Terapia de reposição hormonal por mais de 5 anos Ingestão alcoólica excessiva</p>

Figura 6 - Fatores de risco para câncer de mama (SBM- 2001).

Os fatores de risco para o câncer de mama já foram descritos anteriormente e são bem conhecidos, no entanto em cerca de 50% a 80% dos casos de câncer de

mama estes fatores não estão bem identificados, sugerindo que novas características possam estar envolvidas com esta neoplasia (LEON, 2009). O conhecimento científico acumulado até agora indica que menos de 50% dos casos de câncer de mama podem ser explicados pelos principais fatores de risco descritos (THULER, 2003).

Na reunião de consenso da Sociedade Brasileira de Mastologia, em 2001, foi aceito que a gênese da neoplasia maligna da mama ocorre pelo resultado da interação de fatores genéticos, com estilo de vida, hábito reprodutivo e meio ambiente. Portanto existe uma tendência a correlacionar a etiologia da neoplasia maligna da mama com agentes não infecciosos e epigenéticos, no entanto, como já referido anteriormente, vários autores há alguns anos têm demonstrado evidências da presença de agentes virais no desenvolvimento da neoplasia mamária (NACKERDIEN, 2008).

2.1.1.6 Diagnóstico Clínico e Complementar

O câncer é uma patologia com localizações e aspectos clínico-patológicos múltiplos e não possui sintomas ou sinais patognomônicos, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica (INCA 2010).

Algumas queixas devem ser valorizadas e pesquisadas. É comum o relato de mastalgia, esta pode ser cíclica quando se apresenta de forma periódica, quase sempre pré-menstrual e decorre principalmente de causas hormonais e também podem manifestar-se sem periodicidade, consideradas acíclicas, estas se

subdividem em musculoesqueléticas e verdadeiras. As mastalgias acíclicas musculoesqueléticas são decorrentes de alterações em estruturas anatómicas vizinhas, como as osteocondrites, afecções de coluna cervical e torácica, vícios de postura, nevralgia do intercostal. Dentre as mastalgias verdadeiras, os processos infecciosos e os tumores são os mais freqüentemente encontrados. Além destes podemos encontrar nos ambulatórios de mastologia as descargas papilares caracterizadas pela eliminação de secreção através da papila, é um sinal inespecífico, que deve ser valorizado apenas quando se apresenta unilateral, uniductal, espontâneo, de cor sanguínea ou em água de rocha (FRANCO, 1997).

Os tumores podem ser císticos ou sólidos. Os cistos são entidades usualmente benignas, podem ser assintomáticos e são definidos pela presença de espaços delimitados por paredes e cheios de líquido, são extremamente variáveis em tamanho e número e podem ser microscópicos ou macroscópicos. Estas lesões são quase sempre multifocais e bilaterais e quase nunca malignas. Os tumores sólidos benignos têm como representante mais comum o fibroadenoma que apresenta aspecto microscópico típico, caracterizado pelo componente epitelial e estromal, manifesta-se como massa esférica circunscrita que pode ser uni lobular ou multilobular. Este tumor é comumente móvel, indolor, esférico e com margens lisas.

Os tumores malignos apresentam características epiteliais, mesenquimais ou mistas, geralmente localizam-se na unidade lóbulo-ductal-terminal e podem manifestar-se como neoplasias *in situ* ou invasoras. Os carcinomas *in situ* caracterizam-se histologicamente por hiper Cromasia e pleomorfismo nuclear e alteração celular do revestimento epitelial sem evidências de invasão estromal,

podem ser ductais ou lobulares, inclui-se nesta classificação a Doença de Paget do mamilo caracterizada por lesão eczematosa do mamilo apresentando células de carcinoma na histologia da epiderme, não é considerada tipo especial, mas fenômeno conseqüente a um carcinoma *in situ* no qual as células malignas alcançaram a epiderme por epidermotaxia. Podem manifestar-se como massas palpáveis ou apenas como alterações somente diagnosticadas à mamografia. Os tumores malignos invasivos representam 65% a 80% das neoplasias malignas mamárias, classificam-se em ductais, lobulares, tipos especiais como os medulares, mucinosos, papilares, tubulares, adenóide císticos, secretores, apócrinos, cribiformes e também neoplasias sarcomatosas mamárias. Manifestam-se como tumores sólidos, com consistência firme, decorrente da fibroplasia estromal induzida pelas células neoplásicas que mostram freqüentemente estrias opacas representativas da elastose periductal e/ou perivascular. Podem, também, ser espiculados, circunscritos, difusos sem limites definidos com o tecido mamário adjacente. Se os carcinomas ductais têm comportamento local previsível com crescimento local expansivo e tendência à disseminação via ductos locais, os lobulares são imprevisíveis, ou seja, crescem de maneira insidiosa por entre as estruturas locais, sem padrão radial, com tendência à multicentricidade (BUZAID; BARROS, 2007).

Importante durante a anamnese detalhada é identificar as pacientes de risco para o desenvolvimento do câncer através de inquérito dos antecedentes pessoais, como avaliação da idade de menarca e menopausa, características dos ciclos menstruais, paridade e amamentação, uso de terapias hormonais, obesidade e hábitos como o tabagismo e alcoolismo; avaliar nos antecedentes familiares a

presença de casos de câncer, o grau de parentesco e o órgão afetado; realizar exame físico detalhado através da inspeção estática, dinâmica e manobras de palpação da mama e das cadeias axilares e supra e infra claviculares bilaterais; submeter as pacientes aos exames de rastreamento de mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética mamária, se necessário, e então identificar nos exames complementares de imagem os sinais de malignidade diretos e indiretos. Com o aperfeiçoamento das técnicas de ultrassonografia, mamografia e ressonância magnética os diagnósticos precoces dos cânceres de mama tornaram-se mais freqüentes e iniciou-se a era do manejo das lesões impalpáveis. Novas tecnologias vêm sendo apresentadas para o diagnóstico pré-cirúrgico, como as punções aspirativas de agulha fina que predizem o diagnóstico citológico, punções aspirativas com agulha grossa (core biopsy e mamotomia) que fornecem fragmentos tumorais para o estudo anatomopatológico, oferecendo possibilidade de adequado planejamento pré- cirúrgico e o estudo imunohistoquímico. Segundo estudo de Giannotti (2003), estas técnicas vêm aumentando ainda mais as chances de cura para os carcinomas mamários, pelo diagnóstico precoce de lesões mínimas, além de evitarem procedimentos cirúrgicos, internações e auxiliarem na diminuição dos custos, tanto nas lesões benignas, como nas lesões pré-cancerosas e neoplasias malignas.

O método de manejo de lesões para diagnóstico pré-cirúrgico tem se consolidado como um avanço importante, principalmente no diagnóstico de lesões nodulares e de micro calcificações, mesmo quando não forem palpáveis, principalmente por ser de baixo custo, baixa mortalidade e apresentar sensibilidade e especificidade elevadas no diagnóstico de carcinomas. Em 1993, o American

College of Radiology aprovou o sistema *Breast Imaging Reporting and Data System* (BIRADS™). Este sistema consiste em uma classificação radiológica para as lesões mamárias, com a finalidade de padronizar os achados radiológicos e correlacionar com os aspectos histopatológicos, sendo coerentemente aceita e utilizada (GIANNOTTI, 2003).

2.1.1.7 Tratamento

Após o diagnóstico, a escolha do tratamento poderá ser cirúrgico, radioterápico ou quimioterápico, conduzido por uma correta abordagem da lesão que influenciará decisivamente sobre o prognóstico da paciente. Nos últimos anos, grandes mudanças propiciaram importantes avanços. As técnicas radicais de remoção de todo tecido mamário em conjunto com os músculos grande e pequeno peitoral e abordagem da drenagem linfática axilar homolateral foram baseadas na teoria de Willian Stewart Halsted, emérito cirurgião americano que idealizou a técnica e a publicou em 1894, foi um procedimento que iniciou nova era no tratamento do câncer de mama. Neste período as teorias sobre a disseminação tumoral estavam associadas ao conhecimento anatômico de progressão dos tumores da mama para as cadeias linfáticas axilares e interpeitorais. No entanto, mesmo com resultados desfavoráveis observados, a radicalidade da cirurgia foi ampliada e Urbam (1956) além da mastectomia clássica de Halsted associou o esvaziamento linfático para cadeia mamária interna, conhecida como mastectomia ultra-radical (BOFF, 2006).

Entretanto, nas avaliações realizadas, percebeu-se que esta técnica não acrescentava benefícios e acrescentava mais morbidade ao procedimento, emergindo, então a fase das mastectomias radicais modificadas, citando como as mais importantes as de Pattey-Dyson (1948) que preserva o músculo do grande peitoral e de Madden-Auchinclos (1958) que preserva os dois músculos peitorais (figura 7). Em 1981, Veronesi publicou um clássico estudo demonstrando a segurança do tratamento conservador da mama quando associamos à ressecção tumoral ampla, à linfadenectomia axilar e à radioterapia. Atualmente, a mastologia evolui para a aplicação das técnicas de oncoplástica nos tratamentos conservadores (figura 8), e no manejo seletivo do esvaziamento axilar, através da proposta do Linfonodo Sentinela (LS) que teoricamente seria o primeiro gânglio a ser acometido na cadeia linfática pelo câncer, o LS é marcado pelo corante azul patente e por procedimentos da medicina nuclear associando à linfocintilografia e à marcação com Tecnécio 99, considerando este gânglio como amostragem representativa do status axilar e indicador da necessidade da abordagem axilar completa ou não.



Figura 7- Foto de Mastectomia Radical Pattey com retalho demonstrando radio dermite em paciente do Hospital Ofir Loyola, 2007. Acervo pessoal.

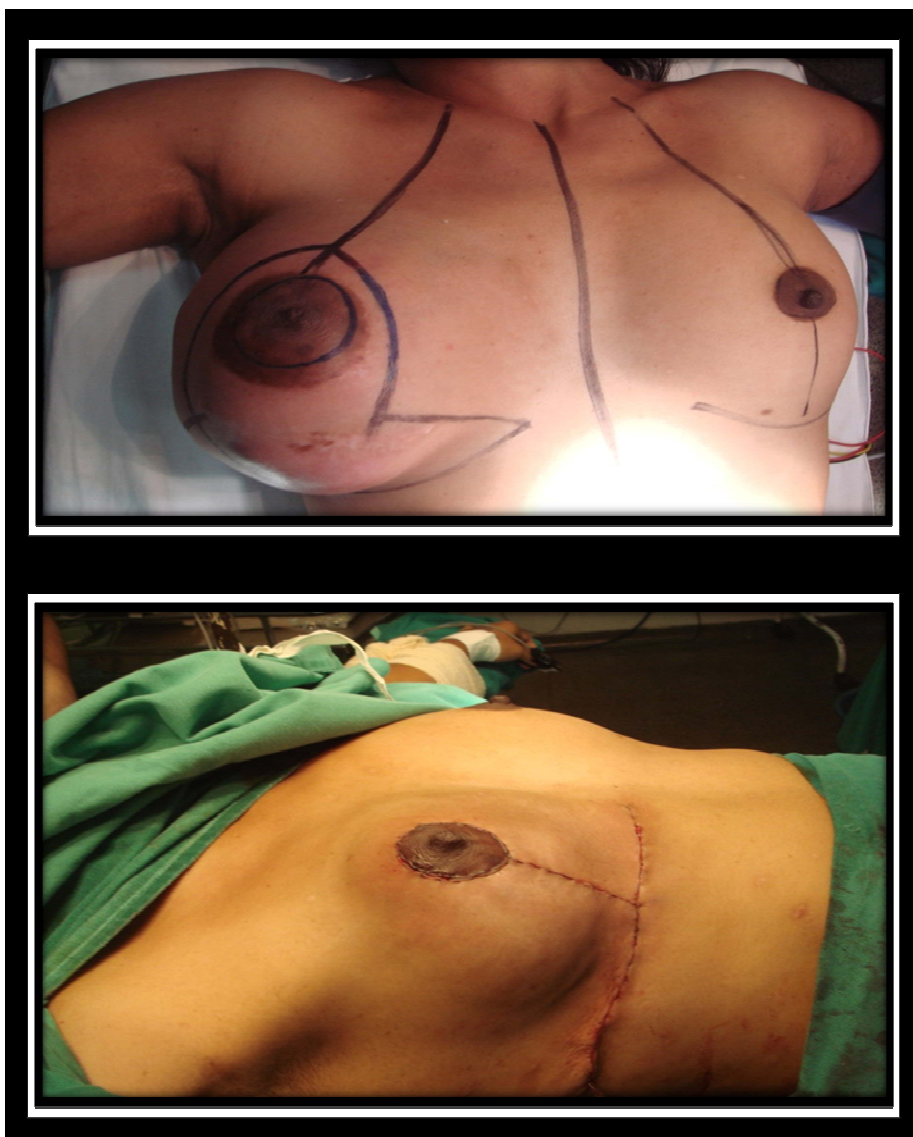


Figura 8- Foto de programação de tratamento cirúrgico conservador e resultado pós- operatório, em paciente do: Hospital Ofir Loyola, em 2008. Acervo pessoal.

A teoria proposta pelo doutor Bernard Fisher, após a segunda metade do século XX, que define o câncer de mama como uma doença sistêmica, estando o prognóstico vinculado à capacidade ou não do tumor em desenvolver metástase por meio da disseminação hematogênica, foi o suporte para o desenvolvimento da cirurgia conservadora de tecido mamário. Embora o conhecimento atual do comportamento biológico do câncer ratifique a teoria sistêmica, ela não pode ser

considerada completamente correta. Acredita-se que há um determinado momento nas fases iniciais da doença onde as células do câncer de mama ainda não possuem capacidade de disseminação pela via hematológica, posto que a diminuição da mortalidade nos diagnósticos realizados em estádios precoces sugere que a metástase pode ser influenciada pelo tempo do diagnóstico. Existe uma grande relação entre controle local da doença e sobrevida global (TIEZZI, 2007).

No tratamento da neoplasia maligna da mama, consideramos um protocolo seguido mundialmente que associa, quando necessário, os procedimentos cirúrgicos à radioterapia e à quimioterapia e/ou hormonioterapia. A cirurgia e a radioterapia oferecem o controle loco-regional da doença e a quimioterapia e/ou hormonioterapia promovem o tratamento sistêmico da doença. Os tratamentos radicais com a retirada total da glândula mamária estão restritos aos tumores maiores, cuja relação do tamanho do tumor e do tamanho da mama seja desfavorável à conservação mamária, ou quando existam outros critérios que contra-indiquem formalmente o tratamento conservador ou a realização da radioterapia. Preferencialmente, com os diagnósticos precoces cada vez mais factíveis, as técnicas utilizadas são de conservação de parte da mama e neste caso, então, sempre associada à radioterapia que é considerada obrigatória em todos os tratamentos conservadores da mama. A indicação da quimioterapia adjuvante (pós-cirúrgica) e a escolha das drogas a serem utilizadas dependem de fatores prognósticos que determinam o risco de recorrência e de morte, os mais relevantes são a idade da paciente, tamanho do tumor, status dos linfonodos, grau histológico, situação dos receptores hormonais e do HER-2 (BUZAID; BARROS, 2007).

Os carcinomas mamários localmente avançados, segundo Buzaid e Katz, (2007), são um grupo de entidades heterogêneas clínicas, biológicas e anatomopatológicas, necessitando, portanto, de abordagem multidisciplinar e sério planejamento terapêutico. Para esses, é necessário o uso de quimioterápicos antes da cirurgia, ou seja, quimioterapia neo- adjuvante, com intuito de realizar controle precoce da doença micro-metastática, avaliação in vivo da resposta ao tratamento, redução do volume tumoral dentre outros.

2.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO

2.2.1 Definição e classificação taxonômica

Os vírus do papiloma humano (HPV) são patógenos responsáveis pela formação de tumores benignos e malignos de pele e mucosa. São membros da família *Papillomaviridae*, na qual passou a ser incluído o gênero *Papillomavirus* e a espécie *Human papillomavirus* com mais de 130 genótipos, podendo ser divididos em tipos cutâneos ou de mucosa (SANCKLEMENTE; GILL, 2002)

2.2.2 Organização Genômica

São vírus não envelopados, 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. O genoma destes vírus consiste de 8-9 janelas de leitura aberta (open reading frames) e de uma região regulatória. Os genes virais

são classificados como, precoces (*early*, E) e tardios (*late*, L) dependendo de quando são expressos. A expressão das proteínas virais é fortemente regulada e dependente da diferenciação celular (CHEN; HUNTER, 2005).

A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, apresentando funções definidas, a E1 tem relação com a replicação viral, E2 com a transcrição e replicação, E4 com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. E5, E6 e E7 estão envolvidos na transformação celular. A região L é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo. Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), variando de 400 a 1000 pbs, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem seqüências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (SOUTO, 2005) (figura 9).

Expressão Gênica	Genes	Função
Precoce	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Controle da transcrição e replicação
	E4	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	E5, E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular
Tardia	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo

Figura 9- Relação entre os genes do HPV e suas requeridas funções (Souto, 2005)

Para integrar-se ao DNA celular, é necessário que haja uma quebra no genoma viral. Esta separação não ocorre de forma aleatória, a maioria ocorre nas

regiões E1 e E2 do vírus. O resultado dessa quebra é uma perda de função desses dois genes, acompanhada de uma desregulação dos genes E6 e E7, resultando em transformação da célula hospedeira. A região do cromossomo ao qual o genoma viral se integra não parece ser essencial para o desenvolvimento carcinogênico, uma vez que estas regiões variam muito (RIVOIRE, 2001). Podemos afirmar que o HPV ratifica seu potencial oncogênico agindo no ciclo celular através da inibição dos genes supressores, parece que a chave para a transformação são as oncoproteínas E6 e E7 as quais trabalham para romper a regulação do ciclo celular, inibindo a apoptose e estimulando a progressão do ciclo celular pela associação com a p53 e inibição da p110, genes supressores tumorais (HENG et al. 2009).

Foi demonstrado que a E6 interage com a proteína p53 e a E7 com a proteína pRb, causando desregulação do ciclo celular (KELLEY, 2005). A proteína E7 fosforilada se liga à forma não fosforilada da proteína Rb e esta interação libera o fator de transcrição E2F antes ligado à proteína Rb (figura 10). Assim, a E2F pode se ligar ao DNA, ativando a transcrição dos genes necessários à síntese do DNA, estimulando de maneira ininterrupta a divisão celular, deixando de regular negativamente o ciclo celular de G1 para S. Essas duas proteínas atuam prevenindo a transformação celular, interrompendo sua divisão e proliferação (PINTO, 2002).

A expressão das proteínas E6 e E7 do HPV são normalmente controladas durante o ciclo viral quando o DNA viral é replicado extra cromossomalmente. As oncoproteínas E6 e E7 são superexpressas quando o genoma viral integra o DNA do hospedeiro, a desregulação desta superexpressão pode causar várias mudanças

na sinalização celular, levando à transformação maligna e a tumorigênese (GANGULY; GARINHAR, 2009).

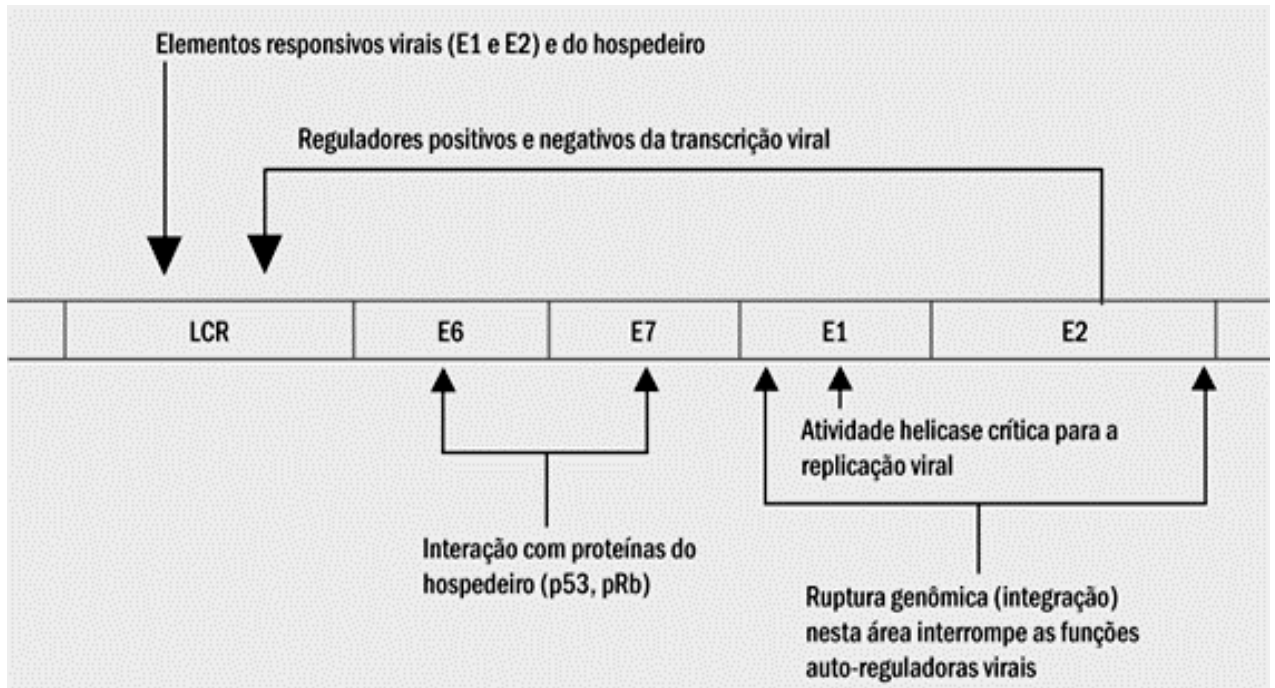


Figura 10- Organização Genômica do HPV.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442002000100011&script=sci_arttext

Os HPV são espécie-específica e exclusivamente epiteliotrópicos. Por ser a célula da camada basal do epitélio escamoso a única capaz de se dividir, o vírus a infecta para induzir a uma lesão persistente. O HPV pode infectar células da camada basal tanto dos epitélios da pele quanto dos epitélios de mucosas que recobrem a boca, garganta, trato respiratório e trato ano genital. Por isso, são divididos em tipos cutâneos e mucosos (ZUR, 1977).

2.2.3 Ciclo Biológico

O ciclo de vida produtivo do HPV está diretamente relacionado à diferenciação celular epitelial, à diferenciação celular anormal do epitélio causada pela infecção do HPV. É um processo que é totalmente dependente da expressão de genes virais. A infecção do Papilomavirus pode ocorrer por micro traumas ocorridos no epitélio, expondo as células basais à entrada do vírus. Após a entrada do vírus nos queratinócitos, na camada basal, o genoma do HPV se estabelece como epissomo, aproximadamente 50 cópias por célula, que por sua vez se replica em sincronia com o DNA da célula hospedeira. Durante a divisão celular, as células basais deixam a camada basal, migram para a região supra basal e começam a se diferenciar. Os queratinócitos, por sua vez, terminam seu ciclo celular logo que são destacados da membrana e as células infectadas por HPV entram na fase S do ciclo celular uma vez atingida a camada supra basal (figura11).

A entrada na fase S resulta na amplificação de genomas virais em mil cópias por célula. Paralelamente à amplificação do DNA, existe a síntese das proteínas E1 e E4 juntamente com proteínas do capsídeo (L1 e L2), resultando na formação dos virions com poder de infecção e liberados ao ambiente na camada superior. Pelo estudo da microscopia eletrônica verificou-se a presença de partículas virais no interior das células de papilomas de pele. Os achados citológicos se traduzem por aumento nuclear, hiper cromasia e cavitação perinuclear, a coilocitose (ROSENBLATT, 2005).

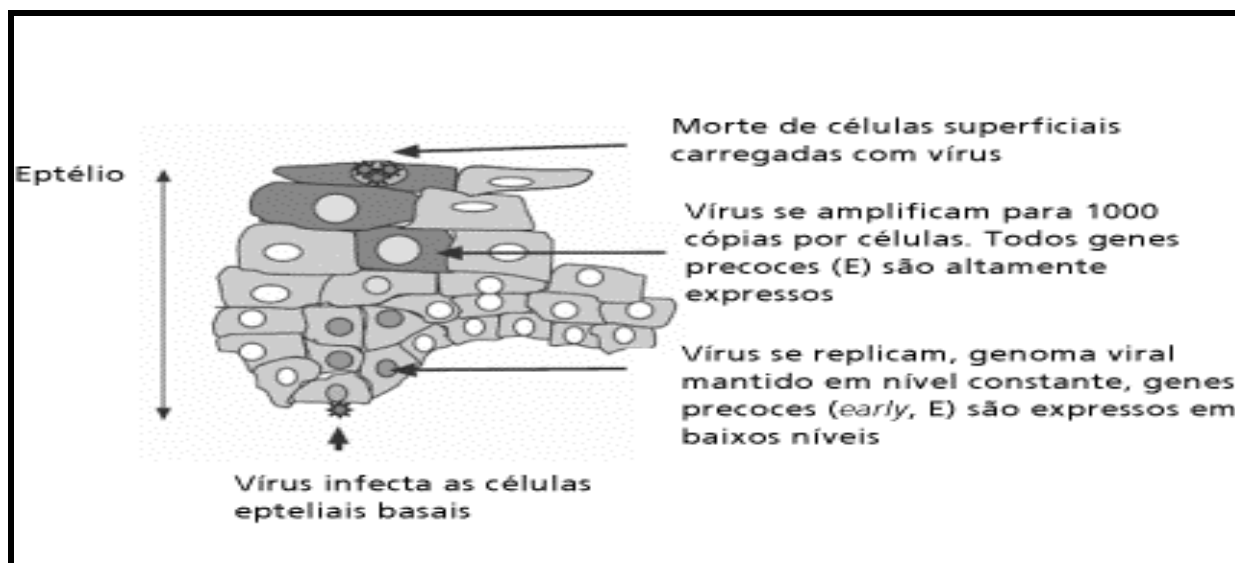


Figura 11-Replicação Viral do HPV.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.Php?pid=S1519-38292006000400012&script=sci_abstract&lng=pt

A infecção viral pelo HPV pode gerar lesões clínicas de forma localizada, subclínica ou latente. De uma maneira geral, o HPV segue o ciclo produtivo viral clássico: adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação do DNA, e maturação (TYRING, 2000). A tradução clínica da infecção do HPV depende do subtipo infectante, podem ser classificados como de baixo risco e alto risco oncogênico. Os principais vírus relacionados como de baixo risco são o 06, 11, 42, 43 e 44 e pertencentes ao grupo de alto risco são os subtipos 16, 18, 31,33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, e 70 e todos são replicados exclusivamente no núcleo da célula hospedeira (DE VILLIERS, 2004). Em lesões de pele benignas, associadas ao HPV, o genoma viral encontra-se separado do DNA celular e surge como um plasmídeo extracromossômico (corpo episomal). Em lesões malignas associadas aos HPV 16 e 18, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros (KAUFMAN; ADAM; VONKA, 2000).

Uma variedade de condições clínicas pode ser atribuída aos HPV, desde lesões inócuas até lesões como o câncer. A infecção genital pelo HPV pode resultar em três possibilidades de manifestação clínica: (a) verrugas ano genitais, também chamadas de condilomas acuminados, que se localizam ao redor dos genitais e do ânus, estão geralmente relacionadas aos HPV 06 e 11 (baixo risco), e não levam ao câncer, muitas são assintomáticas e podem ter uma resolução espontânea em 03 a 04 meses, caso contrário, podem permanecer na mucosa ou até aumentarem de tamanho e número; (b) infecção latente ou inativa, neste tipo de manifestação o indivíduo não apresenta sintomas aparentes da infecção; (c) infecção ativa, que está associada aos tipos de HPV de alto risco, responsáveis pelas alterações celulares que podem resultar em neoplasias intra-epiteliais (CAVALCANTI, 2006).

Considerando o papel do vírus na indução da carcinogênese, também salientamos que apenas uma pequena fração, menos de 3%, das mulheres portadoras de HPV de alto risco desenvolve lesões de câncer de colo do útero. Além disso, a evolução das lesões de NIC (Neoplasia Intra-epitelial Cervical) para carcinomas cervicais invasivos só ocorre após um longo período de latência, estimado entre cinco a vinte anos, além disto, observamos que as células infectadas com expressão constante dos genes E6 e E7 não se apresentam imortalizadas – sugerem que a presença do vírus é necessária, mas não é suficiente para a transformação celular. Acredita-se na existência de moduladores virais ou celulares agindo como co-fatores. A utilização por longos períodos de contraceptivos orais, a paridade, o tabagismo, o número de parceiros sexuais e a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis, como, por exemplo, por *Herpesvirus 2* e *Chlamydia trachomatis*, parecem exercer uma influência positiva no surgimento dos

carcinomas cervicais (MUNOZ, 2003). Entretanto, Bosch (2002) chama a atenção para a possibilidade de que algumas dessas associações, como o número de parceiros ou a presença de outras DST, sejam circunstanciais e não causais, refletindo medidas indiretas de exposição ao HPV. Fatores genéticos do hospedeiro como o polimorfismo no códon 72 da proteína p53, com relevante papel no controle do ciclo celular, e o polimorfismo nos genes MHC (*major histocompatibility complex*) de classe I (em humanos, HLA-A, HLA-B e HLA-C), com relevante papel em eventos imunológicos, conferem uma menor ou maior susceptibilidade às infecções por HPVs de alto risco (CAMARA, 2000). Portanto, conclui-se que o comportamento biológico das lesões HPV induzidas é pleomórfico, há remissão espontânea em 30% dos condilomas. Os índices de remissão dependem do tipo e do potencial oncogênico viral. Sugere-se que uma deficiência dos mecanismos de imunovigilância seria responsável pelo desenvolvimento de lesões malignas (ROSENBLATT, 2005).

A partir da 3ª década do século passado, estudos epidemiológicos sugeriram o contato sexual como via de transmissão do Papilomavírus Humano baseados nas pesquisas realizadas em esposas dos soldados portadores de verrugas genitais que voltavam das guerras na Coreia e no Japão, demonstrando simultaneidade das lesões (BARRET, 1954).

Atualmente, considera-se bem estabelecido que o principal meio de contato dos HPVs é a transmissão sexual em cerca de 90%, podendo também ocorrer por transmissão não sexual, onde observamos a possibilidade de transmissão familiar ou nosocomial por fômites. Outra forma de acometimento é por meio da via materno-

fetal: gestacional, intraparto ou periparto. A via não sexual através dos fômites: toalhas e roupas íntimas podem justificar o aparecimento de verrugas em crianças e mulheres sem atividade sexual, embora se acredite que a resistência do vírus fora do organismo seja por um breve período de tempo. Parece ser a superfície de contato um importante meio de disseminação. Os virions do papiloma vírus são liberados quando o envelope cornificado de células descama. O método de transmissão do Papilomavírus Humano para os tumores mamários poderia ser a partir da atividade sexual ou através de disseminação viral ductal retrógrada. Especula-se que o HPV possa ser transmitido do períneo à mama pelas mãos das mulheres já contaminadas (KAN, 2005).

Os fatores de risco clássicos para a neoplasia cervical são basicamente os mesmos relacionados à infecção pelo HPV. Dentre estes fatores, podemos citar: início precoce da vida sexual; ter vários parceiros sexuais ao longo da vida; multiparidade; tabagismo; outras doenças sexualmente transmissíveis; redução da imunidade celular pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); uso de anticoncepcional oral; variantes do HPV com diferenças nas propriedades biológicas e de patogenicidade; deficiências nutricionais; consumo de álcool; falha da utilização da camisinha; herança genética ligada aos antígenos de histocompatibilidade HLA classe I e II (CAVALCANTE, 2006).

A infecção genital pelo HPV é mais freqüente em mulheres jovens sexualmente ativas, entre 18 e 30 anos de idade. Depois dos 30 anos, ocorre uma acentuada diminuição nos casos de novas infecções. Por outro lado, o câncer cervical é mais comum em mulheres acima dos 35 anos, atingindo o pico de

incidência geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos, sugerindo que as infecções se dão realmente em mulheres mais jovens, e as infecções persistentes provocadas principalmente por HPV de alto risco são responsáveis pela maioria dos casos que evoluem lentamente para o câncer cervical (FEHRMANN, 2003).

2.2.4 Epidemiologia

Considerando os casos de câncer de colo uterino, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, observamos que a previsão para 2010, no Brasil, segundo dados do INCA é de aproximadamente 18.430 novos casos, sendo o mais incidente na região Norte (23/100.000), enquanto que as regiões Centro-Oeste (20/100.000) e Nordeste (18/100.000) ocupam a segunda posição mais freqüente e nas regiões Sul (21/100.000) e Sudeste (16/100.000), a terceira posição.

Acredita-se que quase todos os casos de câncer de colo de útero são provocados por um dos 13 tipos de HPVs oncogênicos. Até a década de 1990, o teste Papanicolau era a principal estratégia utilizada em programas de rastreamento para o controle do câncer do colo do útero. Mais recentemente, novos métodos de rastreamento, como testes de detecção do DNA do HPV e inspeção visual do colo do útero, utilizando ácido acético ou lugol, são apontados como eficazes na redução das taxas de mortalidade por câncer do colo do útero. No Brasil, o exame citopatológico é a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde prioritariamente para mulheres de 25 a 59 anos (INCA,2010)

É estimado que uma redução de cerca de 80% da mortalidade por esse câncer pode ser alcançada através do rastreamento de mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos com o teste de Papanicolau e tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade ou carcinoma *in situ*. Para que tal ocorra, é necessário garantir a integralidade e a qualidade do programa de rastreamento e o seguimento das pacientes. Recentemente, agências de regulamentação de medicamentos de vários países aprovaram para comercialização vacinas contra a infecção pelo HPV. No Brasil, está registrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a vacina quadrivalente contra HPV 06, 11, 16 e 18, desenvolvida para a prevenção de infecção pelos tipos virais mais comuns nas verrugas genitais (HPV 06 e 11) e no câncer do colo do útero (HPV 16 e 18) é indicada para mulheres com idade de 9 a 26 anos; e a vacina bivalente contra HPV tipos 16 e 18, associados ao câncer do colo do útero, é indicada para a mulheres de 10 a 19 anos. A inclusão da vacina contra HPV no Programa Nacional de Imunizações está em discussão pelo Ministério da Saúde e pode se constituir, no futuro, em importante ferramenta no controle do câncer do colo do útero (INCA 2010).

2.2.5 Relação do Papilomavírus Humano e Cânceres Humanos

Sabemos que alguns vírus são capazes de influenciar no funcionamento do ciclo celular, promovendo a ativação de proto-oncogenes e inibindo os genes supressores tumorais, provocando imortalização celular. Após várias pesquisas, Band (1995), comprovou que o Papilomavírus Humano (HPV) é capaz de promover imortalização pré- neoplásica e transformação das células epiteliais normais da mama.

A relação entre HPV e câncer cervical não é mais questionada, ao contrário, evidências moleculares e epidemiológicas indicam claramente que certos tipos de HPV são a principal causa de câncer cervical (MUÑOZ, 2003). O HPV é considerado como principal vírus oncogênico em humanos e tem sido identificado em neoplasias malignas ginecológicas especialmente os de colo uterino e em suas lesões precursoras. Eles são freqüentemente encontrados em outros tumores anogenitais como os de vulva/ vagina, ânus e pênis. Além disto, a associação com os cânceres de cabeça e pescoço está agora bem documentada. No entanto existem trabalhos controversos na detecção do HPV em outros tumores (PETERSEN, 2008).

Dados revelam que, excetuando o coração e o rim, o Papilomavírus Humano foi detectado em todos os outros órgãos: bexiga, próstata, cavidade oral, laringe, esôfago, estômago, cólon, vagina/vulva, pênis, mama, endométrio, ovário e pulmão. Alguns achados correlacionando a presença do HPV em tumores são notáveis: câncer de cólon 97%, câncer de pulmão 80%, câncer de mama 74%. Estes dados apontam para as diferenças geográficas na incidência do HPV em diferentes populações. O HPV é, no entanto, um importante biomarcador em diagnóstico moleculares dos tumores. Os carcinomas HPV positivos têm não somente uma etiologia distinta, mas também um fenótipo morfológico particular (PETERSEN, 2008).

No início dos anos noventa, a seqüência do Papilomavírus Humano (HPV) foi identificada em tumor mamário humano. Di Lonardo (1992) foi um dos pioneiros a referir a relação entre HPV e o câncer de mama, demonstrando o DNA HPV 16 em

29,4% dos carcinomas mamários usando PCR com primers específicos para HPV 11, HPV 16 e HPV18, Beatriz Pogo (1995) do Mount Sinai Hospital, NY, USA identificou seqüências vindas do MMTV em tumores mamários humanos que tinham baixa homologia com a seqüência gênica do HERVs.

No entanto, a recente identificação do HPV por De Villiers (2005), Kan (2005) em tumores mamários tem estabelecido o HPV como um forte oncovírus formador de câncer de mama. Foi demonstrado que nos tumores mamilares, nos quais o HPV tinha sido identificado, havia características histológicas típicas da associação do HPV com o câncer (assim como o câncer cervical). As estas características identificadas incluíam hiperplasia epitelial e aparência sugestiva de coilocitose, que consiste em uma alteração em células escamosas intermediárias maduras, contendo um, dois ou mais núcleos discarióticos, além desta também foram identificadas metaplasias escamosas de ductos lactíferos. Os coilócitos são células epiteliais caracterizadas por um halo perinuclear, condensadas ao redor do núcleo e são especificamente associadas à infecção do HPV e ao processo oncogênico precoce (GLENN, 2009).

Cada vez mais se têm pesquisado a associação do HPV e a neoplasia maligna da mama. Na Austrália um estudo usando primers específicos para HPV 16, HPV18 e HPV 33, demonstrou a presença de HPV 18 em 48% dos espécimes de câncer de mama. Entretanto não detectou nem o HPV 16 nem o HPV33 em seu estudo (KAN, 2005). Outros estudos, conduzidos na China e no Japão, os quais utilizaram primers para HPV 16, HPV 18 e HPV 33, detectaram HPV 33 em 41,7%

dos cânceres de mama na China e 11,1% dos cânceres de mama no Japão (YU, 1999).

Examinando aréolas e espécimes de câncer de mama, outra pesquisa detectou HPVs de alto-risco e de baixo-risco em 86% das amostras, utilizando primers GP5+/6+ e primers FAP para tipos de HPV cutâneos e primers CP (DE VILLIERS, 2005). Existe relato de caso demonstrando “lymphoepithelioma-like carcinoma” da mama com encontro de Papilomavírus humano com DNA tipo 18 e 33 na paciente, e cuja histerectomia prévia revelou carcinoma in situ com a presença de HPV-33 (KULKA et al. 2008).

Observa-se, principalmente, a presença do HPV de alto risco nos cânceres mamários. Na maioria das pesquisas, o HPV de alto risco foi encontrado somente em tecidos tumorais, mas não em tecidos normais, com exceção do estudo da Turquia, no qual o vírus também foi detectado em tecido normal, mas em menor percentagem que nos cânceres (GUMUS, 2006).

Estudos prévios demonstraram a presença do HPV de alto risco, tipos 16, 18 e 33 em espécimes de câncer de mama provenientes de diversas populações em todo o mundo. A prevalência do HPV positivo no câncer de mama nestes estudos variou de 4% no México a 86% nas mulheres americanas (HENG, 2009).

As controvérsias a respeito do papel do HPV no câncer de mama podem ocorrer devido às dificuldades em se detectar o vírus nos espécimes mamários, em contraste com a relativa facilidade de detecção nos cânceres cervicais (LINDEL,

2007; KHAN, 2008). Falhas na identificação viral são relativamente comuns, por isso alguns estudos mostram que é necessário o uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do vírus no câncer de mama. A análise da PCR em tempo real confirmou a presença da integração do DNA viral em todas as amostras de HPV16, no estudo de KHAN (2008).

Outros vírus já foram considerados na gênese da neoplasia maligna mamária, embora a relação tumor de mama e vírus seja dificilmente evidenciável. Há alguns anos, muitos estudos têm tentado comprovar a identificação de vírus no tecido mamário. Bittner (1943) demonstrou três co-factores no desenvolvimento de tumores mamários em camundongos: a suscetibilidade herdada, as ações hormonais e uma influência transmissível no leite materno. Esta influência transmissível parecia ser um retrovírus, agora conhecido como o vírus do tumor mamário murino (MMTV). Este vírus é oncogênico no ambiente estrogênico de camundonga, apresentando cepas que possuem susceptibilidade genética para tumores mamários. Ao longo dos anos, consideráveis evidências emergiram sugerindo que há um retrovírus quase idêntico para o MMTV, além de co-factores adicionais, que poderiam influenciar a carcinogênese materna. Este vírus é comumente conhecido como HHMMTV. Além disso, uma prova surgiu recentemente demonstrando que outros vírus, tais como o HPV e EBV, podem também iniciar ou promover carcinogênese mamária. Moore (1971) demonstrou que o leite humano de mulheres com alto risco para câncer de mama contém partículas morfológicamente semelhantes ao MMTV. Essas partículas têm uma forma de "cogumelo", com picos no envelope viral, sendo evidenciado que essas partículas tinham atividade transcriptase reversa, propriedade encontrada em retrovírus oncogênico. Desde então, se acumularam provas demonstrando a

presença de um retrovírus que é homólogo ao MMTV em tecidos de câncer de mama humano, em culturas de células normais da mama humana e em culturas de células de câncer de mama humano. As características morfológicas das partículas em ambos, do ser humano e do leite murino parecem ser quase idênticas e são exclusivas entre todos os vírus. Quando estas características são consideradas em conjunto com a homologia de 98% da seqüência de nucleotídeos entre o HHMMTV e o MMTV, parece provável que estes vírus são variantes uns dos outros (LAWSON,2000).

Existem mais de 250 trabalhos na literatura correlacionando HPV e câncer de mama, no entanto uma análise na região Norte em uma população que apresenta alta prevalência de Papilomavírus Humano ainda não havia sido realizada. Na atualidade muitas pesquisas ratificam esta influência, no entanto ainda há necessidade de maior aprofundamento nos estudos entre vírus e tumores mamários. O HPV pode ser um fator em uma cadeia de eventos que levariam à formação tumoral mamária.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Pesquisar a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e seus subtipos mais freqüentes em mulheres portadoras de tumores mamários benignos e malignos, assim como tecidos mamários normais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar a presença do DNA HPV nos tumores mamários malignos, benignos e mamas normais

Subtipar o Papilomavírus Humano (HPV) nos tumores mamários que se apresentarem positivos para o DNA HPV através da técnica de PCR em tempo real para os subtipos mais importantes 06, 11, 16 e 18.

Comparar os resultados moleculares do DNA HPV com a presença de receptores hormonais, o follow up e com os achados clínicos em cada grupo estudado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O comitê de Ética em pesquisa do NMT/UFPA apreciou a proposta da pesquisa sob o protocolo N°048/2008-CEP/NMT e considerou que foram atendidas as exigências da Resolução 196/96, aprovando a realização do estudo. As pacientes serão beneficiadas com a informação relevante quanto à presença do HPV em suas amostras e os riscos serão mínimos, considerando que o procedimento de coleta de amostras foi realizado durante o tratamento cirúrgico convencional e indicado para o tratamento da doença em cada grupo de pacientes. O sujeito da pesquisa em cada grupo foi incluído somente quando este assinou o termo de consentimento livre e esclarecido, declarando aceitar participar da pesquisa.

Para análise dos resultados usamos os testes: Exato de Fisher, Teste G de independência, Regressão Logística. O valor de alfa: 0,05.

4.1. LOCAL DE ESTUDO

A coleta das amostras foi realizada no Hospital Ofir Loyola, considerado hospital de referência para o tratamento oncológico na região Norte, que conta com serviço especializado na área de Mastologia e para onde são referenciados pacientes do próprio estado - capital e interior- e de estados adjacentes que não possuem serviço de alta complexidade. As amostras foram colhidas no período de Outubro de 2008 a junho de 2010. Para os controles, selecionamos pacientes que foram submetidas à mamoplastia redutora, tanto no Hospital Ofir Loyola como em hospitais particulares.

4.2 CASUÍSTICA

Grupo de pacientes: selecionamos aleatoriamente 45 pacientes portadoras de neoplasia mamária, constituindo 28 neoplasias malignas e 17 tumores benignos. Grupo controle: Foram coletadas 18 amostras de tecido mamário normal, retro areolares colhidos de peças de mamoplastias redutoras.

As pacientes foram submetidas ao formulário que contém inquérito sobre idade, paridade, antecedentes menstruais, métodos anticoncepcionais, número de parceiros sexuais, hábitos (tabagismo, alcoolismo, uso de drogas), antecedentes pessoais e familiares mórbidos (apêndice A) e ao termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice B).

4.2.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

4.2.1.1 Critérios de Inclusão

Pacientes do sexo feminino, acima de 18 anos de idade, portadoras de tumores mamários malignos e benignos, pacientes que se submeterem de modo espontâneo à mamoplastia redutora e que aceitem participar de modo livre e esclarecido da pesquisa.

4.2.1.2 Critérios de Exclusão

Como critérios de exclusão, enumeramos as pacientes que não desejarem participar da pesquisa, que não consigam responder adequadamente o formulário, tumores que sejam provenientes de outros hospitais, tumores que não foram adequadamente congelados.

4.2.2 Obtenção do Material Biológico

As amostras foram colhidas durante o ato cirúrgico; exérese de tumor de mama, biópsias incisionais e biópsias excisionais, previamente indicado para cada paciente, em ambiente hospitalar. Após assepsia da mama, foi retirado o tumor ou fragmento tumoral, e então incisado 0,5cm do tumor para o estudo, que imediatamente foi colocado em tubete, previamente identificado, e enviado ao congelador a 20° negativos. Após o término da cirurgia, o material foi enviado ao Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical para armazenamento e posterior análise.

As amostras de mamas normais foram coletadas de mamoplastias redutoras, tendo como critério de amostra tecidual 0,5cm do tecido retro areolar, e, então, obedecendo às mesmas etapas já descritas anteriormente.

4.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO E TIPAGEM DO HPV

Para pesquisa de HPV foram utilizados dois procedimentos de PCR: PCR 01 para a detecção do DNA viral e PCR 02 para a tipagem. As amostras positivas para HPV foram tipadas para os vírus dos tipos 06, 11,16 e 18.

O princípio básico da PCR está na capacidade de, a partir de quantidades mínimas de DNA, multiplicarem uma determinada seqüência, de modo que esta se torne majoritária na amostra. Na reação de PCR, o fragmento de DNA que desejamos multiplicar (ou amplificar) é chamado de fragmento alvo ou DNA molde e constitui um pedaço do gene que se pretende estudar. Além do DNA molde há também os oligonucleotídeos (também chamados de *primers*) que nada mais são do que pequenos fragmentos de DNA complementares às extremidades da região que se pretende amplificar.

O método pelo qual a PCR funciona é descrito como dois pequenos fragmentos de DNA, tipicamente de 20 pares de bases que são sintetizados em laboratório. Esses são os *primers*, complementares de cada uma das extremidades da seqüência de DNA de interesse, sempre na direção 5' > 3'.

Na detecção do DNA de HPV pela PCR, utilizaram-se os "primers" MY 09/11, que amplificam uma região muito conservada de 450 pares de bases (pb) do gene L1 de HPV. Sendo realizadas as seguintes etapas: amplificação do DNA - alvo pela reação de PCR na presença de uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores específicos (MY09 e MY11); DNA polimerase termoestável de *Thermos-aquaticus* $\frac{3}{4}$ Taq DNA polimerase (CENTIBIOT, Brasil); quatro desoxirribonucleotídeos; e um tampão contendo 03 MgCl₂, juntamente com dois oligonucleotídeos $\frac{3}{4}$ G-73 e G-74 $\frac{3}{4}$, que amplificam para o gene da beta-globina (268 pares de base) e representam o controle interno da reação para avaliação da integridade e da suficiência de DNA de cada amostra para a amplificação.

Para a detecção do HPV e sua tipagem, foram realizadas duas etapas de PCR, uma para detecção do vírus e a outra análise de PCR em tempo real, apenas para as amostras positivas, para tipagem dos subtipos 06, 11, 16 e 18.

4.3.1 PCR 01

Para cada reação, foi utilizado 100ng de DNA em 20 μ L de tampão composta por 20 mM Tris-HCL (pH 8.4 ou 8.6), 0,25-1.5mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.02mM dNTP, 200 nM de oligos, MY9 e MY11 (específicos para detecção de HPV) e 0,25 unidades de Taq polimerase. A reação foi de um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, e 35 ciclos da amplificação de PCR serão executados. Cada ciclo consiste em 94°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorrerá à 72°C por 5 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE. As amostras positivas apresentaram uma banda de 440 pb.

4.3.2 PCR 02

Foi realizada PCR em tempo real, e utilizados oligos LUX específicos e kit Platinum® qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Para cada amostra, foi utilizado 0,1 μ g de DNA, 200 nM de cada oligo iniciador, 1 μ L de ROX Dye, e água Milli Q autoclavada qsp 20 μ L. Foram executados 40 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 30 segundo e 72°C segundos. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle de qualidade da reação. Os resultados foram analisados pelo ABI 7000 SDS *software*.

Para controle da presença de DNA nas amostras e para avaliar se não há inibidor de reação, todas as amostras foram submetidas a PCR para o gene GAPDH (Gylceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), que é um gene constitutivo e deve estar amplificado em todas as amostras. Para evitar contaminação com DNA estranho, foram utilizadas salas independentes para cada uma das etapas: extração do DNA, preparação do mix, procedimento da PCR e eletroforese.

Na análise dos receptores hormonais foi utilizada a técnica de Imunoistoquímica realizada pelo Hospital Ofir Loyola em todas as pacientes portadoras de tumores malignos de mama.

Nome do primers	Seqüências
b-Globina:	F: 5' TCGGAGTCAACGGATTTGG 3' R: 5' GATGGCAACAATATCCACTTTACCA 3'
HPV geral	MY09: 5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3' MY11: 5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG-3'
HPV6:	5- CGGCCCTGCGTTAATGATTGCG-3' 5'- CTATGGCTCGTCCTCCTGTGG-3'
HPV11:	5'- CGGAGCTTGTAGTTGTCTGATGTCTC G-3' 5'- GATGTGACAGCAACGTCCGACT-3'
HPV16:	5'-: CGGATTGCGTGCAACATATTCATC G-3' 5'- GCCACTGTCTACTTGCCTCCTG-3'
HPV18:	5'-:CGACCGAGTCCACAGTGTCCAGGT?G-3' 5'-CGTATTCCAGCACCGTGTCC-3'

Tabela 3- Seqüências dos primers utilizados nas reações de PCR. Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical, UFPA, 2010.

5. RESULTADOS

Nesta pesquisa, foram examinados 63 espécimes cirúrgicos classificados em 28 tumores malignos, 17 tumores benignos e 18 amostras de mamoplastias. Os tipos histológicos encontrados nos tumores benignos foram 13 fibroadenomas, 01 adenose, 02 tumores filóides benignos, 01 lesão linfoproliferativa, 01 mastite crônica e 01 fibrose. E na histologia dos tumores malignos, encontramos 25 carcinomas ductais invasivos, 01 sarcoma osteogênico, 01 carcinoma apócrino, 01 carcinoma mucinoso e 01 carcinoma cribiforme (tipos especiais).

Foram correlacionadas, nas portadoras de tumor, variáveis como: idade, paridade, número de parceiros, antecedentes mórbidos pessoais, história familiar de câncer, número de parceiros, menarca, imunohistoquímica e *follow up* e, então, sua relação com o achado de DNA HPV para cada grupo. Nas amostras de mamoplastias redutoras apenas realizamos a tipagem do DNA HPV através da técnica de PCR, servindo como controle.

As portadoras de tumores, incluindo benignos e malignos, apresentaram idade que variavam de 18 a 109 anos, e que foram divididas por categorias: abaixo de 40 anos, entre 40 e 49 anos, entre 50 e 59 anos e acima de 60 anos. Observamos que 80% das pacientes se encontravam nos extremos de idade: < 40 anos (40%) e > 60 anos (40%). Na relação entre as portadoras de tumores malignos e benignos e pacientes sadias, obtivemos a média de idade de 54,8 anos para as que apresentavam tumor, 35,2 para as pacientes sem tumor e de 50,2 para as portadoras de DNA HPV.

Ao relacionarmos a idade das pacientes que se submeteram à mamoplastia e as que apresentavam tumores mamários, observamos um p-valor de 0,0001 muito significativo de acordo com os dados relacionados na literatura. Quando avaliamos a presença do DNA HPV e pacientes sadias o p-valor foi de 0,006 também apresentando alta significância. Estes achados mostram a idade como importante fator de risco na incidência das neoplasias malignas e na presença do HPV (figuras 12 e 13).

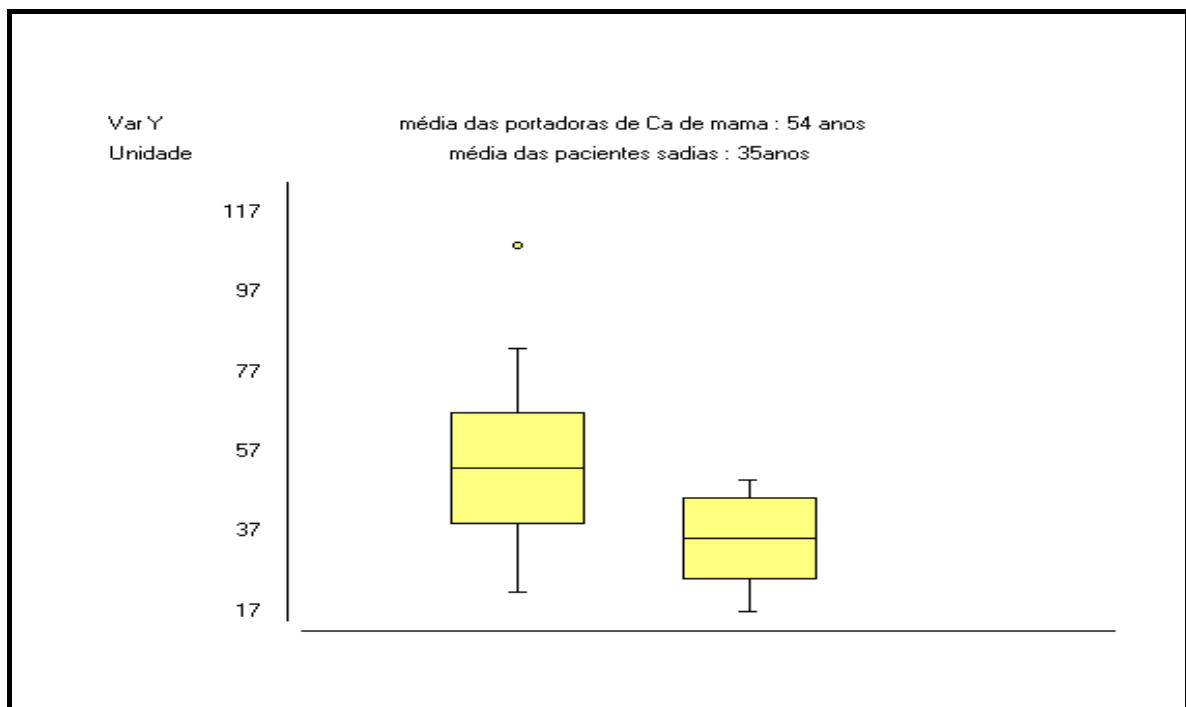


Figura 12- Faixa etária comparando as portadoras de tumor e mamas normais. A média de idade do primeiro grupo foi de 54 anos e a média de idade das pacientes normais foi de 35 anos,

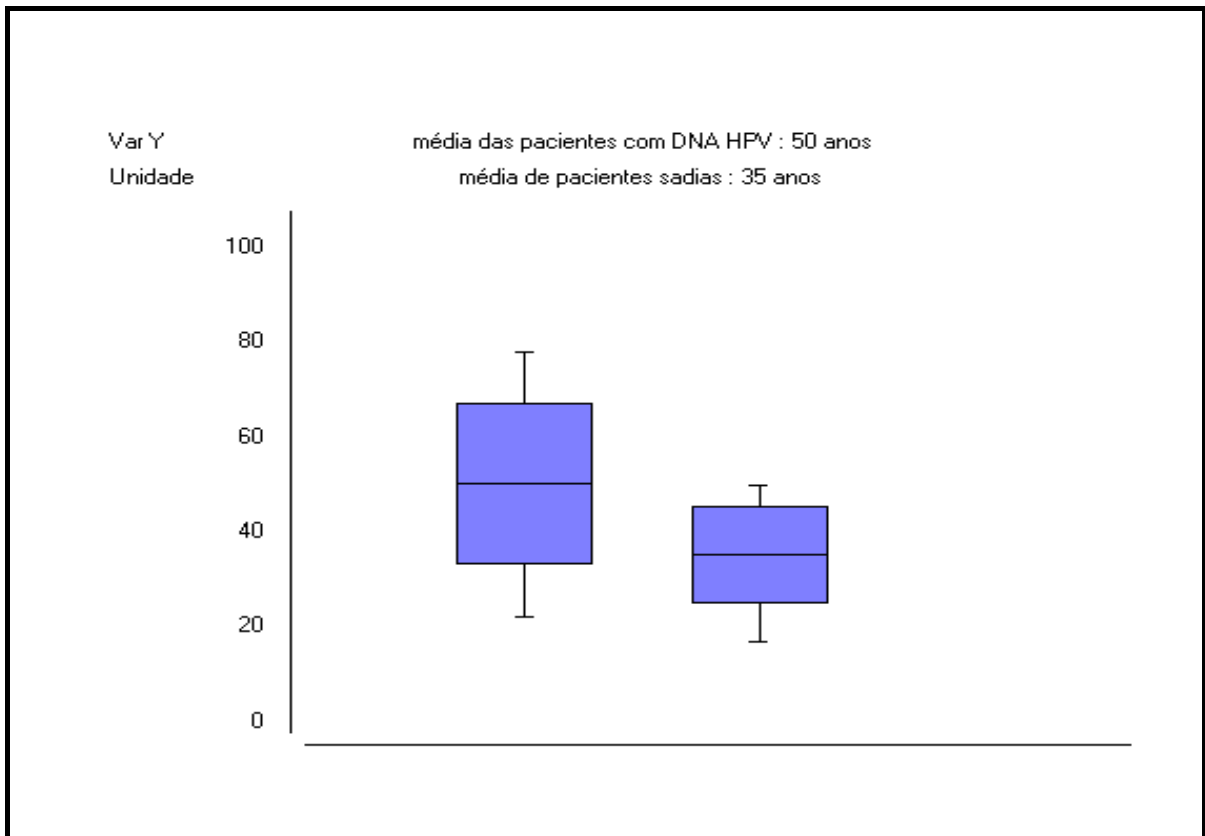


Figura 13- Faixa etária comparando as portadoras de HPV e mamas normais. A média de idade das pacientes DNA HPV positivo foi de 50 anos e a média de idade das pacientes sadias foi de 35 anos.

Considerando o perfil obstétrico, observamos que apenas 05 pacientes (10,2%) eram nuligestas, destas encontramos 04 tumores benignos, caracterizados como fibroadenomas e apenas uma neoplasia maligna: carcinoma ductal invasivo. Vinte e cinco pacientes (55,5%) apresentaram até 03 gestações e vinte pacientes (44,4%) apresentaram mais de 03 gestações e ao submetermos os resultados ao teste G de Independência o p- valor foi de 0,78, sem significância estatística (figura 14).

No comportamento sexual, agrupamos as pacientes em até 03 parceiros, somando 38 das 45 pacientes e as que referiam mais de 03 parceiros apenas 07 mulheres. Ao correlacionarmos o grupo portador da presença do DNA HPV ao número de parceiros, observamos que apenas 01 paciente apresentava mais de 03 parceiros. A variável número de parceiros em relação à presença de DNA HPV em nossa pesquisa mostrou um p-valor de 0,66, sem relevância estatística.

Quanto aos antecedentes mórbidos pessoais/hábitos, os mais referidos, dentre as portadoras de tumor, foram o sedentarismo em 29 pacientes, o tabagismo em 09 pacientes, o alcoolismo em três pacientes, portadoras de DST três pacientes, destas duas apresentavam HPV genital e uma paciente referiu hipertensão arterial sistêmica. Quando avaliamos o parâmetro antecedente pessoal de HPV genital com a presença do DNA HPV no tumor mamário, colhemos como resultado um p-valor de 0,98, sem significância estatística.

Na nossa amostragem entre tumores benignos e malignos, 15 mulheres apresentaram antecedentes familiares de algum tipo de câncer, em sete delas a neoplasia maligna familiar era da glândula mamária, e dentre estas pacientes cinco também possuíam como antecedente pessoal a neoplasia maligna da mama. Relacionando a presença de antecedente familiar de câncer à presença do HPV, observamos que o p-valor foi de 0,46, sem valor estatístico relevante.

	casos : 45 (100 %)	HPV positivos: 11 casos	HPV negativos: 34 casos	p-valor
<u>Tipo histológico:</u>				
Maligno	28 (62,2%)	11(100%)	17 (50%)	p=0,0031
Benigno	17 (37,7%)	00 (0%)	17 (50%)	
<u>AF de Câncer</u>				
Sim	15 (33,3%)	05 (45,4%)	10 (29,4%)	p= 0,46
Não	30 (66,6%)	06 (54,5%)	24 (70,5%)	
<u>AP de HPV</u>				
Sim	34 (75,5%)	00 (0%)	02 (100%)	p= 0,98
Não	11 (24,4%)	11 (100%)	32 (0%)	
<u>Paridade</u>				
Até 03 partos	25 (55,5%)	06 (54,5%)	19 (55,8%)	p= 0,78
Mais 03 partos	20 (44,4%)	05 (45,4%)	15 (44,1%)	
<u>Uso de ACO</u>				
Sim	03 (6,66%)	01 (9,09%)	02 (5,8%)	p= 0,98
Não	42 (93,3%)	10 (90,9%)	32 (94,1%)	
<u>Parceiros</u>				
Até 03	38 (84,4%)	10 (90,9%)	28 (82,3%)	p= 0,66
Mais de 03	07 (15,5%)	01 (9,09%)	06 (17,6%)	
<u>Menarca</u>				
=< 12 anos	16 (35,5%)	01 (9,09%)	15 (44,1%)	p=0,06
>12 anos	29 (64,4%)	10 (90,9%)	19 (55,8%)	

Tabela 4- Principais resultados da pesquisa: tipo histológico, antecedentes familiares e pessoais paridade, uso de anticoncepcionais, número de parceiros e idade da menarca.

A idade da menarca e o uso de anticoncepcionais correlacionados com a presença do DNA HPV também não apresentaram p-valor significativo. Consideramos também o tempo de aparecimento do tumor e observamos que o evento neoplasia maligna e a presença do HPV, não sofrem influência pelo intervalo de tempo referido pela paciente entre o início da doença e tempo do diagnóstico, consideramos esta informação, pela maioria das pacientes, muito subjetiva não expressando verdadeiramente a realidade.

Foi avaliado o perfil imunohistoquímico, levando em consideração a presença de receptores de estrogênio e progesterona, neoplasia maligna e presença do DNA HPV. Observamos que as pacientes portadoras de neoplasia maligna e DNA HPV positivo apresentaram 63,63% de receptores hormonais positivos, 9,10% apresentaram receptores hormonais negativos e 27,27% não efetivaram o exame.

Na relação entre o *follow up* das pacientes portadoras de câncer de mama, após 01 ano de diagnóstico, e a presença do HPV consideramos como evento desfavorável a ocorrência de recidiva local, metástase à distância e óbito e como evento favorável a sobrevida livre de doença. Foi aplicado o teste de regressão logística, utilizado quando a variável resposta é qualitativa com dois resultados possíveis, e encontramos um p-valor muito significativo 0,0034 e um OR (odds ratio) de 8,6, ou seja, a chance do prognóstico desfavorável ocorrer é 06 vezes maior nas portadoras de DNA HPV.

Regressão Logística (Logit)

No. de 0 (valor zero) Obs: Estes valores referem-se à variável dependente Y

No. de 1 (valor um)

Número de Variáveis Independentes: Número de Casos: Função Objeto: Máxima Verossimilhança Valor Final: Estimação de Y: Exibir

-2*log(verossimilhança)

Para este modelo Só Intercepto Qui-Quadrado G. Liberdade (p)

Logit $P_i = -1.1787 + (2.1595 X_1)$

Variáveis	Coefficiente	Erro padrão	Z	p-valor	odds ratio	IC 95%
Intercepto	-1.1787	0.4043
X1	2.1595	0.7885	2.7386	0.0062	8.6667	1.85 a 40.65

TUMOR	IDADE	AF	HPV	RE	RP	HER 2	FOLLOW UP
Ca ductal Invasivo	32 anos	S/ AMF	+	Positivo	Positivo	Positivo 1	ÓBITO
Ca ductal Invasivo	46 anos	S/ AMF	+	Positivo	Positivo	Positivo 1	Meta loco-regional
Ca ductal Invasivo	50 anos	S/ AMF	+	Não feito	Não feito	Não feito	SLD
Carcinoma Apocrino	66 anos	S/ AMF	+	Não feito	Não feito	Não feito	SLD
Ca ductal Invasivo	38 anos	Sobrinho Ca pâncreas	+	Positivo	Positivo	Positivo 1	Meta loco-regional
Ca ductal Invasivo	37 anos	Tia Ca útero	+	Não feito	Não feito	Não feito	ÓBITO
Ca ductal Invasivo	64 anos	02 Tias Ca mama	+	Não feito	Não feito	Não feito	Meta Pulmonar
Ca ductal Invasivo	22 anos	S/ AMF	+	Positivo	Positivo	Positivo 1	Meta cerebral
Ca ductal Invasivo	61 anos	S/ AMF	+	Negativo	Negativo	Negativo	Meta loco-regional
Carcinoma Mucinoso	78 anos	Filha Ca mama	+	Positivo	Positivo	Negativo	SLD
Ca ductal Invasivo	59 anos	Irma Ca mama	+	Positivo	Positivo	Positivo 1	Meta loco-regional

Tabela 4- Principais resultados da pesquisa: tumor maligno, idade, antecedentes familiares, presença de DNA HPV, imunohistoquímica e follow up.

TUMOR	IDADE	AMF	HPV	RE	RP	HER2	FOLLOW UP
Ca ductal invasivo	53 anos	S/ AMF	-	Negativo	Negativo	+ 2	SLD
Sarcoma Osteogênico	61 anos	S/ AMF	-	Negativo	Negativo	+ 1	OBITO
Ca ductal invasivo	50 anos	Irmão Ca próstata	-	Positivo	Positivo	+ 1	SLD
Ca ductal invasivo	109 anos	S/ AMF	-	Negativo	Negativo	+2	OBITO
Ca ductal invasivo	46 anos	S/ AMF	-	Negativo	Negativo	+3	SLD
Ca ductal invasivo	45 anos	S/ AMF	-	Negativo	Negativo	+ 1	Meta Pleural
Ca ductal invasivo	56 anos	S/ AMF	-	Positivo	Positivo	+ 1	SLD
Ca ductal invasivo	48 anos	S/ AMF	-	Positivo	Positivo	+ 1	SLD
Ca ductal invasivo	48 anos	Pai Ca próstata	-				OBITO
Ca ductal invasivo	83 anos	S/ AMF	-				SLD
Ca ductal invasivo	74 anos	Tia Ca mama	-				Meta Pulmonar
Ca ductal invasivo	38 anos	Tia Ca mama	-	Positivo	Positivo	+ 3	Meta Pleural
Ca ductal invasivo	54 anos	Mãe Ca pulmão	-	Não feito	Não feito	Não feito	SLD
Ca ductal invasivo	64 anos	Mãe Ca mama	-	Não feito	Não feito	Não feito	Meta Locoregional
Ca ductal invasivo	58 anos	S/ AMF	-	Positivo	Positivo	+ 1	OBITO
Ca ductal invasivo	52 anos	S/ AMF	-	Não feito	Não feito	Não feito	SLD
Ca ductal invasivo	44 anos	S/ AMF	-	Positivo	Positivo	+1	SLD

Tabela 4- Principais resultados da pesquisa: tumor maligno, idade, antecedentes familiares, ausência de DNA HPV, imunohistoquímica e follow up.

Dentro do perfil maligno, encontramos pacientes cuja faixa etária variou entre 22 e 109 anos, mais 50% apresentaram 03 ou mais gestações, e 14 das 29 pacientes referiram antecedentes familiares de algum tipo de neoplasia maligna, e, como antecedentes mórbidos pessoais o sedentarismo foi o mais relatado.

A positividade do DNA HPV foi encontrada apenas nos tumores malignos, 11 dentre os 28 tumores malignos. Nos tumores benignos e nas mamoplastias de controle não encontramos positividade do DNA HPV. Este resultado foi submetido ao teste exato de Fisher, considerando duas hipóteses: H_0 = A malignidade do tumor não depende da presença do DNA HPV e H_1 = A malignidade do tumor depende da presença do DNA HPV, o p-valor encontrado foi de 0,0031, mostrando alta significância no resultado. Realizado teste de regressão logística, observamos clara relação entre a ocorrência de câncer e HPV, considerando Y: neoplasia presente= 1; neoplasia ausente= 0 e X: HPV presente =1; ausente= 0.

Na avaliação da subtipagem do DNA HPV, as amostras positivas foram testadas para os subtipos 6, 11, 16 e 18. Foram encontrados 06 subtipos HPV 16, 03 tumores positivos para HPV 18, sendo que dois deles eram também HPV16 positivo. Não encontramos positividade para os subtipos HPV 06 e HPV 11. Quatro tumores não apresentaram positividade para os subtipos analisados, provavelmente por apresentarem subtipagem para DNA HPV não testada.

TUMORES	HPV 06	HPV 11	HPV 16	HPV 18
M2	-	-	+	-
M3	-	-	-	+
M11	-	-	+	-
M12	-	-	-	-
M13	-	-	+	+
M14	-	-	+	-
M15	-	-	+	+
M16	-	-	+	-
M18	-	-	-	-
M37	-	-	-	-
M39	-	-	-	-

Tabela 5- Representação das amostras tumorais com positividade para DNA HPV e avaliação dos subtipos de HPV encontrados.

Foram realizados testes de qualidade que conferiram autenticidade às análises moleculares. A técnica utilizada foi a reação da polimerase em cadeia (PCR) que é uma técnica que amplifica segmentos específicos de DNA do vírus do HPV, através da desnaturação por calor, pareamento com *primers* específicos e polimerização com enzimas (DNA-polimerase), gerando-se milhões de fragmentos idênticos ao do DNA investigado.

6. DISCUSSÃO

A identificação do DNA HPV foi encontrada em 11 fragmentos tumorais, todas estas amostras pertenciam à pacientes portadoras de câncer de mama. Dentre as 63 amostras pesquisadas, somente as malignas demonstraram positividade para a seqüência do DNA HPV, avaliadas pelo Teste Exato de Fisher mostrando um p-valor: 0,0031. Estes dados são ratificados por diversos autores ao longo da história: Di Lonardo et al (1992); Yu et al (1999); De Villiers et al (2004); Kan (2005); Gumus et al (2006); Lindel et al (2007); Kulka et al (2008); Khan et al (2008); Lawson et al (2006); Heng et al (2009) e Amarante et al (2009). Pesquisas continuam tentando evidenciar a relação entre a presença do DNA HPV e o desenvolvimento do câncer de mama, no entanto, devido ao complexo perfil da neoplasia maligna da mama e a multiplicidade de fatores que concorrem para o seu aparecimento, acreditamos ser o Papilomavírus Humano mais um, dentre muitos, fator adverso presente na cascata de eventos indutores e promotores de câncer.

Na pesquisa dos subtipos de DNA HPV, os achados confirmaram a presença da seqüência do DNA HPV 16 e do DNA HPV 18 nas neoplasias mamárias malignas, mas não detectamos os subtipos 06 e 11. Dentre as amostras positivas 54,5% apresentaram a seqüência do DNA HPV 16 e 27,2% foram portadoras do DNA HPV 18, além disto, 18,1% demonstraram co-positividade para os DNA HPV 16 e 18. Estes dados confirmam os achados da literatura de Di Lonardo et al (1992), De Villiers et al (2004) e também de Heng et al (2005) ao observar a prevalência do HPV 16 e 18 considerados como de alto risco em 33 pacientes portadoras de câncer de mama, de Khan (2008) com o encontro da

integração do DNA HPV 16 viral em todas as amostras e de Gumus (2006) com o encontro dos HPV de alto risco somente nos tecidos tumorais e não em amostras de mama normais, com exceção do estudo da Turquia que também detectou o vírus em tecidos normais embora em menor percentagem. Nossos achados confirmam a maior predominância dos subtipos de maior potencial oncogênico, a identificação foi encontrada em 39,2% dos tumores malignos e em nenhum tumor benigno ou amostras de tecido mamário normal.

A incidência das neoplasias mamárias malignas relacionadas com a faixa etária de risco também demonstrou grande significância estatística, ratificando os dados de Thuler (2003) que confirmam que com o aumento da faixa etária há também maior risco de apresentar câncer de mama e que cerca de 60-70% dos casos novos de câncer incidem entre 40 e 60 anos. A faixa etária das portadoras de DNA HPV apresentou p-valor altamente relevante, confirmando o estudo de Fehrmann e Laimins (2003), que a infecção pelo HPV é mais freqüente nas mulheres mais jovens.

Contrariando os achados de Cavalcante (2006), os perfis de paridade, tabagismo, número de parceiros não apresentaram importância estatística quando relacionados com a presença do DNA HPV.

A imunohistoquímica demonstrou grande percentagem de receptores positivos nas portadoras de DNA HPV, os receptores de estrogênio atuam como regulador do crescimento celular, proliferação e diferenciação do tecido mamário e são considerados como os mais importantes marcadores biológicos de resposta

terapêutica. Estes receptores mediam a transcrição gênica e atuam estimulando a atividade proliferativa. O estradiol se liga aos receptores estrogênicos e induz à produção de TGF- α , IGF1, VEGF, PDGF nas células epiteliais e que, depois de liberados, voltam a estimular a divisão celular dessas próprias células por efeito autócrino. Segundo Lawson (2000), o estrogênio endógeno tem papel central na etiologia do câncer de mama e os níveis séricos de estradiol são positivamente correlacionados com o alto risco para neoplasia mamária.

No *follow up*, evidenciamos que os eventos desfavoráveis como recidivas locais, metástase e óbito foram muito mais evidenciados nas portadoras de DNA HPV. Dentre as 11 portadoras de câncer e DNA HPV, 05 delas apresentaram recidiva loco-regional, 01 metástase cerebral, 02 óbitos e apenas 03 permaneceram livre de doença após 01 ano de seguimento (OR: 8,6), confirmando os achados de Petersen (2008) de que os carcinomas HPV positivos têm não somente uma etiologia distinta, mas um fenótipo biológico particular.

Acreditamos não ser possível associar a presença do HPV como fator indutor do câncer de mama, mas provavelmente como fator influenciador na evolução da neoplasia mamária, atuando através de seus mecanismos oncogênicos já descritos, a inibição do gene supressor p53 e a presença de ambiente hormonal favorável. O estudo de Shai (2008) demonstra que a perda do gene p53 associado à presença do estrogênio e à ocorrência de oncogenes do Papilomavírus induz ao câncer cervical e mamário. Nesta pesquisa foi constatado que, no modelo murino, o estrogênio exógeno não somente encurta o tempo de latência tumoral, mas também

resulta na mudança dos receptores hormonais completamente negativos para predominantemente positivos.

Este estudo também refere que os tumores mamários podem apresentar características de ambos os tipos celulares mioepiteliais e luminais consistente com tumores que são provenientes de uma célula progenitora multipotente. A perda do p53 e o estrogênio exógeno resultam em um subconjunto de tumores mamários com fenótipo sugestivo de uma transição epitélio- mesenquimal. As alterações genéticas e os programas de sinalização são capazes de reprimir ou estimular a proliferação celular. Estas alterações influenciam a morfologia e o comportamento da célula neoplásica, perdendo a adesão e a sensibilidade à apoptose, sendo capazes de degradar a matriz extracelular e obter potencial de migração e estas alterações definem o que chamamos de transição epitélio- mesenquimal, que apresenta como característica a perda da E- caderina (molécula de adesão) e a expressão da vimentina (proteína de origem mesodérmica) e está geralmente associada com doença mais grave, assim como a formação de células que podem migrar e metastatizar para outros sítios, estabelecendo tumores secundários, caracterizando um perfil tumoral mais agressivo (SHAY, 2008).

Recomenda-se que mais estudos sejam realizados para aprofundamento do tema, avaliando a relação de pior prognóstico nas portadoras de DNA HPV e tumores de mama e a possível inclusão de vacinas para HPV que pudesse beneficiar este perfil de pacientes.

7. CONCLUSÃO

Encontramos positividade para o DNA HPV em 11 casos dentre os 28 tumores malignos (39,2%) e em nenhuma amostra de tumor benigno ou nas amostras de mamoplastia redutora. As amostras positivas revelaram os DNA HPV oncogênicos 16 e 18, no entanto, nenhuma amostra apresentou HPV 06 e 11.

A faixa etária acima de 50 anos confirmou ser importante fator de risco tanto para a presença de câncer de mama quanto para a presença de DNA HPV.

Na avaliação da Imunohistoquímica, mais de 60% dos tumores DNA HPV positivo apresentaram receptores hormonais positivos, aproximadamente 9% não revelaram receptores hormonais, no entanto mais de 29% não foram avaliados.

O seguimento destas pacientes mostrou a prevalência de eventos desfavoráveis: recidiva local, metástases e óbitos nas pacientes portadoras de DNA HPV e um odds ratio de 8,6, ou seja, risco 08 vezes maior de ocorrer nos tumores malignos HPV positivos.

Os achados demonstraram associação entre a presença do DNA HPV e a neoplasia maligna da mama, contudo não podemos afirmar a relação etiológica deste com os cânceres de mama.

Existem evidências, observadas nas pacientes avaliadas neste trabalho, de que a relação de tumores mamários associados à presença de DNA HPV apresentam um mau prognóstico na evolução da neoplasia mamária.

REFERÊNCIAS

AMARANTE M. K; WATANABE, M. A. The possible involvement of virus in Breast Cancer. **Journal Cancer Research Clinic Oncology**, Brasilia,DF v. 135, n. 3, p. 329-337.nov., 2009.

AMIR, E; SERUGA, B; SERRANO, R; OCANA, A. Targeting DNA repair in breast cancer: A clinical and translational update. **Cancer Treatment Reviews**. Doi:10.1016/j. etrv. 2010.03.06.

BLAND, V. Pre-neoplastic transformation of human mammary epithelial cells. **Seminars in Cancer Biology**. Boston, v. 6, p. 185-192. Jun., 1995.

BLAND , K. COPELAND, III. **A MAMA, Tratado compreensivo das doenças benignas e malignas**, tradução Nelson Gomes de Oliveira . São Paulo, editora Manole, 1994

BARROS, A; NAZÁRIO, A. Fatores de risco para o câncer de mama. In: **Câncer da Mama: diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi,1994.

BARRET. T.J.; SILBAR. J. D.; Mc GINLEY.J.P. Genital Warts- a venereal disease. **Jama**, v., 154, n. 4, p. 333-334, Jan.,1954.

BERGMANN, A. **Prevalência de linfedema subsequente a tratamento cirúrgico para câncer de mama no Rio de Janeiro**. 2000 Dissertações (Mestrado)-Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2000.

BITTON, R. J. et al. Cancer Vaccines: an update with special focus on Gangliosideos antigens. **Oncology Reports, Buenos**, Buenos Aires, Argentina, v. 9, n. 2, p. 267-276, Mar., 2002.

BOSCH, F. X; LORINEZ, A; MUÑOZ, N; MEIJER, C. J. L. M; SHAH, K. V. The causal relation between HPV and cervical cancer. **Journal of Clinical Pathology**. Barcelona, Spain, v. 55, n. 4, p. 244-265, Jan., 2002.

BOFF, R; WISINTAINER, F. **Mastologia Moderna: abordagem multidisciplinar**. São Paulo. Editora Mesa-redonda. p. 21-30, 2006.

BOZHANOV, S. S; et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinic pathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, February, 2010. Disponível em:

<<http://www.springerlink.com/content/170p20u43nr03627/>>. Acesso: 20 set. 2010.

BUZAID A. C; BARROS, A. Câncer de Mama: tratamento multidisciplinar. **Dendrix Edição e Design**, São Paulo, p. 43-59, 2007.

CAMARA. G. Os papilomas vírus humanos- HPV, histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas Ciências da Saúde**, v.1, n. 1, p. 149- 158. Disponível em: <<http://www.publicacoesacademicas.uniceub.br/index.php/cienciasaude/article/view/503/324>>. Acesso: 20 set. 2010.

CARDIFF, R. D; BOROWSKY, A. D. Pre-cancer: sequentially acquired or predetermined? **Toxicologic Pathology**, USA, v. 38, n. 1, p. 171-179, Dec.,2009.

CAVALCANTE, M. B. Infecções causadas pelo Papilomavírus Humano: Atualização sobre os aspectos virológicos, epidemiológicos e de diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v 18, n. 01, fev, 2006

CHAGAS, C. Câncer de mama - Etiologia, Fatores de Risco e História Natural. In: FRANCO, J. **Mastologia: formação do especialista**. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1997. 133p.

CHEN, Y. C; HUNTER, D. J. Molecular epidemiology of cancer. **A Cancer Journal for Clinicians**, Boston, v. 55, p. 45-54. Jan., 2005.

CHENG W. F; et al. Induction of human papillomavirus type 16-specific immunologic responses in a normal and an human papillomavirus- infected populations. **Immunology**, v. 115, n. 1, p. 136-49. May, 2005.

DE VILLIERS et al E. M. Mini review: Heterogeneity of the Human papillomavirus group. **Virology**, German. v. 63,n. 1, p. 4898-4903, nov., 1989.

DE VILLIERS, E. M. et al. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Research**, Washington, v. 7, n. 1, R1-R11, Oct., 2004.

FEHRMANN,F; LAIMINS,L.A. Human papillomaviruses :targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, USA, v., 22, p. 5201-5207. Aug., 2003.

FERNÁNDEZ-CUESTA, L; ANAGANTI, S; HAINAUT, P; OLIVIER, M. Estrogen levels act as a rheostat on p53 levels and modulate p53-dependent responses in breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research Treatment**, France, v. 11, Mar., 2010. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/97051r428n285888/>>. Acesso em: 20 set. 2010.

FRANCO, J. M. **Mastologia: formação do Especialista**. São Paulo: Editora Atheneu, 1997. cap.: 23, p. 203.

GANGULY, N; PARIHAR, S. P. Human Papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **J Biosci**, South Africa, v. 34, n. 1, p. 113-23, Jul., 2009.

GLENN, W. K. et al. Koilocytes indicate a role for Human Papilloma Virus in Breast Cancer. **British Journal of Cancer**. Australia, v. 94, p. 338. Sep, 2009.

GIACOMINI, G. O uso de Vacinas de Células Dendríticas como Imunoterapia para o Câncer: uma pequena revisão. Instituto de Biociências., Campus de Rio Claro, 23, Outubro, 2003. Disponível em: http://prope.unesp.br/xxi_cic/27_35143294860.pdf>. Acesso em: 20 set. 2010.

GIANNOTTI, J. A. et al. Correlação entre diagnóstico por imagem e histologia em lesões não palpáveis de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_49/v02/pdf/ARTIGO1.pdf>. Acesso em: 20 set. 2010.

GOMES-CARNEIRO. Fatores de risco ambientais para o câncer gástrico- visão do toxicologista. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 13, suppl. 1, 1997.

GUERRA, M. R. et al. Risco de Câncer no Brasil, tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Minas Gerais, v. 51, n. 3, p. 227- 234. maio, 2005.

GUMUS, M; et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients normal and tumoral tissue samples. **Journal Experimental Clinical Cancer Research**, Istanbul, v. 25, n. 4, p. 515-21. Dec., 2006.

HENG, B. et. al. Human papilloma virus is associated with breast cancer. **British Journal of Cancer**, Austrália, v. 101, p. 1345-1350. Sep., 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2010- Incidência do Câncer no Brasil,.disponível em: < www.inca.gov>, acesso 18 jul, 2010.

JERRY, D. J; DUNPHY, K. A; HAGEN, M. J. Estrogens, regulation of p53 and breast cancer risk: a balancing act. **Cellular and Molecular Life Sciences**. USA, v. 67, n. 7, p.1017-23. Jan., 2010.

KAN, C. Y. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. **British Journal of Cancer**, Australia, v. 93, n. 8, p. 946-948. October, 2005.

KAUFMAN, R. H; ADAM, E; VONKA, V. Human papillomavirus infection and cervical carcinoma. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 43, p. 363-380. Jun., 2000.

Disponível em:

<http://journals.lww.com/clinicalobgyn/Citation/2000/06000/Human_Papillomavirus_Infection_and_Cervical.16.aspx>. Acesso em: 22 set. 2010.

KASID A. Transfection of v-ras DNA into MCF-7 human breast cancer cells bypasses dependence on estrogen for tumorigenicity. **Science**. 228: 725-728, 1985.

KELSEY, J; GAMMON, M. The Epidemiology of breast cancer. **Epidemiologic Reviews**. New York, v. 12; p. 228-240. May-Jun., 2001.

KELLEY, M. L; KEIGER, K. E; LEE, C. J; HUIBREGTSE, J. M. The global transcriptional effects of the human papillomavirus E6 protein in cervical carcinoma cell lines are mediated by the E6AP ubiquitin ligase. **J Virology**, Texas, v. 79, p. 3737-3747. Mar., 2005.

KHAN, N.A; et al Human Papilloma Virus detected in a female breast carcinoma in Japan. **British Journal of Cancer**, Japan, v. 99, p. 408-414. Jul., 2008.

KULKA, J. et al. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the breast: not Epstein-Barr virus, but human papilloma virus-positive. Human Pathology, **Hungary**, v. 39, p.298-301. Feb., 2008.

LAWSON, J. S. From Bittner to Barr: a viral, diet, and hormone breast cancer a etiology hypothesis. **Breast Cancer Research**, Australia. vol.3: 81-85, 2000.

LAWSON, J; GUNZBURG, W. Viruses and Human Breast Cancer. **Future Microbiology**, Australia, v. 1, p. 33-51. Jun., 2006.

LAWSON, J. S. Do Viruses cause breast cancer? **Methods in Molecular Biology**, Australia, v. 471, p. 421-38. Dec., 2008.

LEON, D. C; et al Human papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. **BMC Cancer**, México, v. 22; p. 9-26, Jan., 2009.

LI, F. et al Beyond Tumorigenesis: Cancer Stem Cells in Metastasis. **Cell Research**, USA, v. 17, p. 3-14, Jan., 2007.

LINDEL, K; FOSTER, A; ALTERMATT, H. J; GREINER, R; GRUBER, G. Breast Cancer and Human Papilloma (HPV) Infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss Women. **The Breast, Switzerland**, v. 16, p. 172-177, Apr., 2007.

MARTIN, M. Molecular Biology of Breast Cancer. **Clinical and Translation Oncology**, Spain, v. 8, n. 1, p. 7-14, Sep., 2007.

MARTIN, D; GUTKIND, J. S. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. **Oncogene**, v. 27, p. S31-42, Dec., 2008.

MOLINA, L. et al. Análise das oportunidades de Diagnóstico Precoce para as Neoplasias Malignas da Mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 2, abr., 2003.

MUÑOZ, N; et al. Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. **The New England Journal of Medicine**. Barcelona, v. 348, p. 518-527. Feb., 2003.

NACKERDIEN, Z. E. Perspectives on microbes as oncogenic infectious agents and implications for breast cancer. **Medical Hypotheses**, USA, v. 71, n. 2, p. 302-306. Aug., 2008.

OTAKE, A.H. **Papel da Dissialogangliosídeos na proliferação e morte celular induzida de melanócitos e melanomas in vitro**. 2005. 165 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-26052006-113740/>>. Acesso em: 16 jul. 2010.

PINTO, A. P; TULIO, S; CRUZ, O. R. HPV co-factors in cervical carcinogenesis. **Revista Associação Médica Brasileira**, Curitiba, v. 48, p. 73-78.jan./mar, 2002.

PETERSEN, I; KLEIN, F. HPV in non-gynecological tumors. **Pathologe**. German, v. 2, p. 118-122. 29 Suppl, Nov., 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19039615>. Acesso em: 13 ago. 2010.

RAUCH, D; et al. T-cell activation promotes tumorigenesis in inflammation-associated cancer. **Retrovirology**.USA, v. 17, p. 116. Dec., 2009.

RIVOIRE, W. et al . Bases Moleculares da Oncogênese Cervical. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio Grande do Sul, v. 47, n. 2 , p. 179-184, jun, 2001.

ROSA, J.M. et al. Natural Killer Cells produce T cell- recruiting chemokines in response to anti-body- coated tumor cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 517-526, 2006.

ROSENBLATT. C. **HPV na prática clínica**: epidemiologia, São Paulo: Atheneu. Cap. 3, p. 25-37, 2005.

SANCLEMENTE, G; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of the European Academy Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 231-240. 2002.

SBM, Sociedade Brasileira de Mastologia. **Projeto Diretrizes**- diagnóstico e tratamento do câncer de mama. São Paulo, SBM, 2001.

SHAY, A; PITOT, H. C; LAMBERT, P. F. P53 Loss Synergize with Estrogen and Papillomaviral Oncogenes to Induce Cervical and Breast Cancers. **Cancer Research**. v. 68. 2008.

SOARES, E. **A perda Concomitante da Heterozigose dos genes BRCA1 e FHIT como um fator prognóstico no Câncer Esporádico de Mama.** 2009. tese (Doutorado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009

SOUTO, R. O Papilomavirus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p.155-160, 2005.

TIEZZI, D. G. Cirurgia Conservadora no Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 428 -434, 2007.

THULER, L. C. Considerações sobre a prevenção do Câncer de Mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. 227- 238, 2003.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v. 43, p. 518-526. 2000.

VIVANCO, M. Biomarkers in breast cancer. **Methods Molecular Biology**. v. 593, p. 137-156. 2010.

WANG, S. E; et al. Oncogenic mutations regulate tumor microenvironment through induction of growth factors and angiogenic mediators. **Oncogene**, v. 29, p. 3335 - 3348, Apr., 2010.

WARD, L. Entendendo o Processo Molecular de Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 4 , ago., 2002.

WEINBERG, R. A. How cancer arises. **Scientific American**. v. 275, p. 62-70. 1996.

WEINBERG, R. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. **Nature**. 304 p. 596-602, 1983

YU, K. D. A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptor-beta (ESR2) gene and breast cancer risk. **Breast Cancer Research**. 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/0j54p75363951137/>>. Acesso em: 12 ago. 2010.

ZHANG, J; et al. RCP is a human breast cancer-promoting gene with Ras-activating function. *The Journal of Clinical Investigation*. v. 119, n. 8, p. 2171-2183. 2009.

ZUR HAUSEN, H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. ***Microbial Immunology***. v. 78, p. 1-30. 1977.

APÊNDICES

Apêndice A - Formulário

1. Qual seu nome completo?
2. Qual sua idade?
3. Qual foi a idade de sua primeira menstruação?
4. Quantas vezes a senhora engravidou, sofreu algum aborto?
5. Quais os métodos anticoncepcionais que utiliza?
6. Com quantos parceiros sexuais a senhora se relacionou?
7. Possui hábitos de tabagismo, alcoolismo, ou faz uso de drogas? pratica atividade física?
8. Possui antecedentes pessoais de HPV ou outras DST? Há quanto tempo percebeu o aparecimento do tumor?
9. Já houve antecedente familiar de câncer?

Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Gostaria de convidar a participar da pesquisa “Detecção Molecular do Papiloma Vírus Humano em amostra proveniente de Tumores Benignos e Malignos da Mama”, trata-se de estudo de um pequeno pedaço do tumor, já retirado, de sua mama e que será enviado ao laboratório para pesquisa de vírus. A senhora está sendo devidamente informada dos riscos que a pesquisa poderia acarretar e de qualquer risco não descrito, não previsível, porém que possa ocorrer em decorrência da pesquisa e que estes riscos serão de inteira responsabilidade dos pesquisadores. Não há qualquer benefício particular pela participação na pesquisa. Além disso, é garantido aos participantes respostas a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida relacionada à pesquisa, recebendo informações atualizadas durante o estudo. Pode o participante retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo sem nenhum dano ao seu atendimento. A senhora, como voluntária terá direito a privacidade, não sendo sua identidade divulgada, mas assinará termo de consentimento. Mesmo sem danos previsíveis decorrentes da pesquisa, fica prevista indenização se necessário.

Este termo foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos da resolução nº. 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, Brasília – DF.

Autorizo minha participação na pesquisa,

Belém __/__/20__

Voluntário