

UNILUS

Centro Universitário Lusíada

Rua Armando Salles de Oliveira, 150
Boqueirão – Santos/SP – Brasil
11050-071
(13) 3202-4500

Carolina Garcia Piva

Acadêmica do Curso de Mestrado em
Clínica Médica do Centro Universitário
Lusíada

Dercy José de Sá Filho

Professor Doutor do Curso de
Mestrado em Clínica Médica do Centro
Universitário Lusíada

AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DO DNA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) NO CARCINOMA DE MAMA EM UM GRUPO DE MULHERES DA BAIXADA SANTISTA

RESUMO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) está associada à gênese de carcinoma de colo uterino. Estudos têm proposto uma associação entre a infecção pelo HPV e câncer do esôfago, laringe, orofaringe, pulmão, mama e urogenital. No entanto, o papel do HPV na patogênese destes tipos de cânceres está menos estabelecido. O câncer de mama é um dos cânceres mais freqüentemente diagnosticado em mulheres no Brasil, entretanto, ainda não está claro se há uma associação entre o HPV e o câncer da mama. Investigar a presença do DNA do HPV nos casos de carcinoma ductal invasivo da mama em um grupo de mulheres da Baixada Santista. 28 amostras foram obtidos de casos de carcinoma ductal invasivo diagnosticados e tratados no Hospital Guilherme Álvaro, em Santos - São Paulo, Brasil, em 2007. O DNA foi extraído do tumor a partir do material em formalina e incluído em parafina, usando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio da amplificação do gene humano CCR-5. A detecção do DNA do HPV foi realizada por PCR utilizando os primers GP5 e GP6. Foram utilizados controles HPV positivos e negativos nas reações da PCR, e a presença do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose. 82% dos DNAs extraídos do tecido foram positivos entendendo presença de material genômico humano através da amplificação do gene CCR-5. As amostras de mama testadas apresentaram resultados negativos para o DNA do HPV, em contraste com a detecção do produto amplificado do HPV no controle positivo utilizado. Nossos resultados estão de acordo com alguns estudos e não mostrou nenhuma evidência do DNA do HPV no carcinoma ductal invasivo da mama em um grupo de mulheres da Baixada Santista.

Palavras-chave: hpv, papilomavírus humano, câncer de mama.

EVALUATION OF THE FREQUENCY OF THE DNA OF THE HUMAN PAPILOMAVIRUS (HPV) IN BREAST CARCINOMA IN A GROUP OF WOMEN FROM THE BAIXADA SANTISTA

ABSTRACT

Human Papillomavirus (HPV) infection is a cause of cervical cancer. Several studies have proposed an association between HPV infection and oesophageal, laryngeal, oropharyngeal, lung, urothelial, breast and colon cancers. However, the role of HPV in the pathogenesis of these types of cancer is less well established. Breast cancer is one of the most frequently diagnosed cancers in women in Brazil. It remains unclear whether there is an association between HPV infection and human breast cancer. To investigate the presence of HPV DNA in cases of invasive ductal carcinoma of the breast. Twenty eight samples were obtained from cases of invasive ductal carcinoma diagnosed and treated at the Hospital Guilherme Álvaro in Santos-São Paulo, Brazil in 2007. DNA was extracted from formalin fixed and paraffin-embedded tumor tissues using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). The quality of DNA extracted was verified by amplifying the human CCR-5 gene. Detection of HPV DNA was performed by PCR using primers GP5 and GP6. HPV positive and negative controls were performed. The presence of DNA was verified by agarose gel electrophoresis. The genomic DNA from paraffin-embedded tumor tissues presented 23 of 28 (82%) positive amplification for the human CCR-5 gene. Breast cancers tested showed negative results for HPV DNA. Our results are in agreement with some series and showed no evidence of HPV DNA in invasive ductal carcinoma of the breast in a group of Brazilian women.

Keywords: hpv, human papillomavirus, breast cancer.

INTRODUÇÃO

Podemos considerar o câncer como sendo um grande problema de saúde pública em países em desenvolvimento e desenvolvidos, pois é responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (GUERRA; GALLO; SILVA, 2005).

O câncer de mama ocupa o primeiro lugar em mortalidade feminina (LEÓN et al., 2009). Para o ano de 2010, no Brasil, o número de casos novos de câncer de mama será de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 01/10/2010).

Existem fatores de riscos associados ao desenvolvimento do câncer de mama. Contudo, os fatores de risco não foram totalmente identificados, o que gerou a tentativa de identificar novos fatores relacionados com essa neoplasia como, por exemplo, as infecções virais (LEÓN et al., 2009).

Já foi demonstrando que o Papilomavírus humano (HPV) pode imortalizar células epiteliais normais da mama. Isso aponta a possibilidade do papel do HPV na carcinogênese da mama (LAWSON; DINH; RAWLINSON, 2001).

O HPV está fortemente relacionado com a história natural do câncer de colo uterino sendo muito bem documentada na atualidade. Também, está associado com um subconjunto de cânceres como ânus, orofaringe, pênis, vulva e vagina. Relatos mostram que vários estudos têm proposto uma associação entre a infecção pelo HPV e o câncer do esôfago, laringe, pulmão, mama e urogenital. No entanto, o papel do HPV na patogênese destes tipos de cânceres é menos estabelecido (GUERRA; GALLO; SILVA, 2005).

Em virtude da importância do Câncer de mama e da infecção do HPV em nosso meio, o estudo proposto foi escolhido diante de dois assuntos importantes para a saúde coletiva. Primeiro, o papel do HPV na carcinogênese que tem sido extensamente estudado desde o início do século 20. Sendo o HPV o principal precursor para o câncer de colo uterino, a infecção genital pelo HPV é considerada a doença viral sexualmente transmissível mais freqüente em todo o mundo, representando importante problema de saúde pública devido à sua alta prevalência e transmissibilidade. Segundo, esta neoplasia é considerada um grande problema de saúde pública por causa da enorme quantidade de mortes decorrentes dela; a soma que se gasta para o tratamento e a invalidez que provoca em pessoas com vida produtiva.

OBJETIVO

OBJETIVO GERAL

Padronizar a metodologia de extração do DNA a partir do material fixado em formalína a 10% e incluídos em parafina.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Identificar a frequência do DNA do Papilomavírus Humano (HPV) no carcinoma ductal invasivo de mama em um grupo de mulheres da Baixada Santista.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente trabalho refere-se a um estudo retrospectivo e transversal. Foram selecionadas e analisadas blocos de parafina de 28 casos de carcinoma mamário de pacientes do sexo feminino. Estas pacientes foram atendidas no Hospital Guilherme Álvaro (HGA) localizado no Município de Santos/SP e tiveram diagnóstico confirmado pelo departamento de patologia para carcinoma ductal invasivo de mama. O material analisado consiste de lâminas histológicas e blocos de parafina de 28 casos de carcinoma mamário de pacientes do sexo feminino.

CASUÍSTICA

Foram selecionadas e analisadas lâminas histológicas do bloco de parafina de 28 casos de carcinoma mamário de pacientes do sexo feminino. Estes casos foram atendidos no Hospital Guilherme Álvaro (HGA) e tiveram diagnóstico confirmado no departamento de patologia de carcinoma ductal invasivo de mama e essas pacientes já realizaram tratamento para tal diagnóstico. O material analisado consiste de amostras fixadas em formalína a 10% incluídas em parafina.

Foram apenas incluídas no presente estudo pacientes do sexo feminino que se encontraram na faixa etária de 50 a 60 anos de idade, na época do diagnóstico, com a média de 54,6 anos de idade, no período de Janeiro de 2007 até Janeiro de 2008.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) do UNILUS, protocolo número 052/2010 de acordo com os requisitos da Resolução CNS 196/96.

PREPARO DAS LÂMINAS E DESPARAFINIZAÇÃO

A partir da análise histológica de cortes corados pela Hematoxilina e Eosina, foram selecionados os blocos de parafina representativos do tumor.

Foram realizados cortes utilizando-se o micrótomo rotativo, com navalhas descartáveis para cada amostra, com a espessura de 6 micrômetros (μm).

Antes da extração do DNA, os cortes presentes nas lâminas passaram pelo processo de desparafinização. Para a desparafinização, foram utilizados banhos (3) com Xilol por 20 minutos cada.

EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de DNA foram extraídas do material parafinado utilizando-se o Kit QIAamp DNA Blood (QIAGEN, Valência, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Conforme orientação do protocolo de extração do Kit utilizado, usamos navalhas descartáveis para cada lâmina, foram raspados os materiais presentes na lâmina nas áreas demarcadas e colocadas em tubos de Eppendorf de 1,5.

Em cada tubo foram adicionados 180 microlitros de tampão ATL (Tissue Lysis Buffer), além de 20 microlitros de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C, durante três horas, e agitadas a cada hora. Após esse período, adicionaram-se a cada tubo 200 microlitros de tampão AL (fornecidos pelo fabricante), sendo os mesmos aquecidos a 70°C durante 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 microlitros de etanol, agitando-se durante 15 segundos.

A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna QIAamp ANA minikit e centrifugado a 8.000 rpm por 2 minutos. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em tubo limpo. Foram adicionados 500 microlitros de tampão AW1 (Wash Buffer 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 microlitros de tampão AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos.

O DNA extraído foi eluído pela adição de 50 microlitros de tampão AE (fornecido pelo fabricante). As amostras foram armazenadas a -20°C

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO GENE HUMANO CCR-5 COMO CONTROLE POSITIVO

Para o controle da eficácia da extração do DNA das lâminas, realizamos a PCR para a amplificação do gene humano CCR-5. Para a realização do mix para cada amostra foram utilizados: 12.8µL de H₂O, 2µL de tampão (10X), 0.6µL de MgCl₂ (50mM), 0.15µL de dnTP (20mM), 0.5µL do *primer* F (200pmol/µL), 0.5µL do *primer* R (200pmol/µL); 0.5µL de Taq DNA polimerase e 3µL de cada amostra, perfazendo um volume total de 20µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen, (EUA) e foram utilizados controles positivos e negativos.

Em um primeiro momento encontramos positividade em 18 amostras das 28 totais utilizando 3µL de volume do material resultante da extração do DNA.

Para resolvermos a questão das 10 amostras negativas, elevamos o volume utilizado de amostra de 3µL para 5µL. Nesta repetição da PCR, encontramos positividade para o gene CCR-5 em mais 5 amostras.

As condições de ciclagem da amplificação foram de 94°C por 10min seguido de 40 ciclos a 94°C por 45s, 58°C por 45s, 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 7min. Foi gerado um produto de amplificação de 241pb.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO HPV

Como controle HPV positivo e para a padronização da técnica da PCR para o HPV, foi utilizado material proveniente de carcinoma cervical NIC III identificado com alterações morfológicas (coilocitos que são sugestivos para a presença do HPV). Foi realizado o corte do material, a confecção da lâmina, o material foi desparafinado e realizada a extração de DNA. Após a extração, foi realizada a PCR para o gene humano CCR5 para verificar a eficácia do procedimento de extração deste controle. A PCR foi positiva para o gene humano CCR-5.

Para a amplificação do gene L1 do HPV foi utilizada a técnica de PCR em duas etapas (*nested* PCR). Na primeira etapa foram utilizados os *primers* MY9/MY11 gerando um produto de 450pb, na segunda etapa foram utilizados os *primers* GP5 e GP6 gerando um produto de 150pb. Para a realização do mix para cada amostra foram utilizados: 34µL de H₂O, 5µL de tampão (10X), 3.5µL de MgCl₂ (50mM), 1µL de dnTP (20mM), 0.5µL de cada *primer* (200pmol/µL); 0.5µL de Taq DNA polimerase e 5µL de cada amostra, perfazendo um volume total de 50µL. Todos os reagentes utilizados foram da Invitrogen, (EUA) e foram utilizados controles positivos e negativos.

Na primeira etapa (*primers* MY9/MY11) as condições de ciclagem da amplificação foram de 94°C por 10min seguido de 40 ciclos a 94°C por 45s, 56°C por 45s, 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 7min.

Na segunda etapa (*primers* GP5/GP6) as condições de ciclagem da amplificação foram de 45°C por 10min seguido de 40 ciclos a 94°C por 45s, 45°C por 45s, 72°C por 45s e uma extensão final de 72°C por 7min (BRULE et al., 12/09/2010). O controle positivo foi seqüenciado sendo identificado como HPV16.

Foram realizadas reações distintas para selecionarmos a melhor opção dos *primers* para a amplificação do HPV na amostra controle. Opção 1) *nested* PCR utilizando os *primers* MY9/MY11 gerando um produto de 450pb e na segunda etapa os *primers* GP5/GP6 gerando um produto de 150pb; Opção 2) amplificação somente com os *primers* MY9/MY11 e Opção3) amplificação somente com os *primers* GP5/ GP6. A primeira e terceira opções deram positivas para o controle HPV, sendo que a opção 3 apresentou a banda com maior intensidade. Provavelmente, à reação MY9/MY11 não funcione adequadamente devido à ligação dos *primers* no DNA alvo e devido ao tamanho do produto de amplificação, 450pb, enquanto a reação com os *primers* GP5/GP6 o produto é significativamente menor, 150pb, facilitando a amplificação do produto específico. Desta forma, selecionamos a opção três utilizando a PCR somente com os *primers* GP5/GP6 nas amostras do trabalho.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da amplificação do gene humano CCR-5 como controle positivo da extração do DNA foram analisados em gel de agarose 3% e TBE 0,5% (89M Tris-borato e 2mM EDTA pH 8,0). A corrida foi realizada a 110V no tempo médio de 40min.

Para comparação de peso molecular do gene CCR-5 amplificado foi utilizado um padrão aplicado junto às amostras no gel. Todas as amostras foram coradas com brometo de etídeo para visualização dos fragmentos sob iluminação ultravioleta.

Da mesma forma, foi realizado a eletroforese em gel de agarose 1% e em TBE 0,5% (89M Tris-borato e 2mM EDTA pH 8,0) para os produtos obtidos da amplificação do DNA do HPV. A eletroforese foi realizada a 110V no tempo médio de 40min.

RESULTADOS

Foram selecionadas e analisadas lâminas histológicas e blocos de parafina de 28 casos de carcinoma mamário de pacientes do sexo feminino. Cada bloco de parafina apresentava tecido proveniente de carcinoma ductal invasivo diagnosticados no HGA. A Figura – 1 demonstra a fotografia de um corte histológico de uma das lâminas selecionadas.

Conforme protocolo de extração, usamos navalhas descartáveis para cada lâmina, onde foram raspados os materiais presentes na lâmina nas áreas demarcadas. A Figura – 2 ilustra este procedimento.

Após a extração foi realizada a PCR para o gene humano CCR5 para verificar a eficácia do procedimento de extração. Foi utilizado um volume de 3µL de cada amostra extraída conjuntamente com controles positivos e negativos. Encontramos positividade em 18 amostras das 28 totais. A Figura – 3 ilustra a eletroforese em gel de agarose a 3% e a visualização das bandas correspondentes a 241 pares de bases. Este resultado pode ter sido obtido devido à baixa quantidade de DNA obtida na extração. Para resolvermos esta questão elevamos o volume utilizado de amostra de 3µL para 5µL. Nesta repetição da PCR encontramos positividade para o gene CCR-5 em mais 5 amostras. A Figura – 4 ilustra esta segunda amplificação. No total 23 das 28 amostras foram positivas (82%) para a amplificação do CCR-5.

A PCR do HPV (*primers* GP5/GP6) foi realizada com as 23 amostras que deram amplificação positivas para o gene CCR5 conjuntamente com o controle positivo e negativo. Nesta reação foi utilizado um volume de 5µL de amostra. Obtivemos a confirmação do controle positivo, entretanto, todas as 23 amostras deram negativas para o HPV.

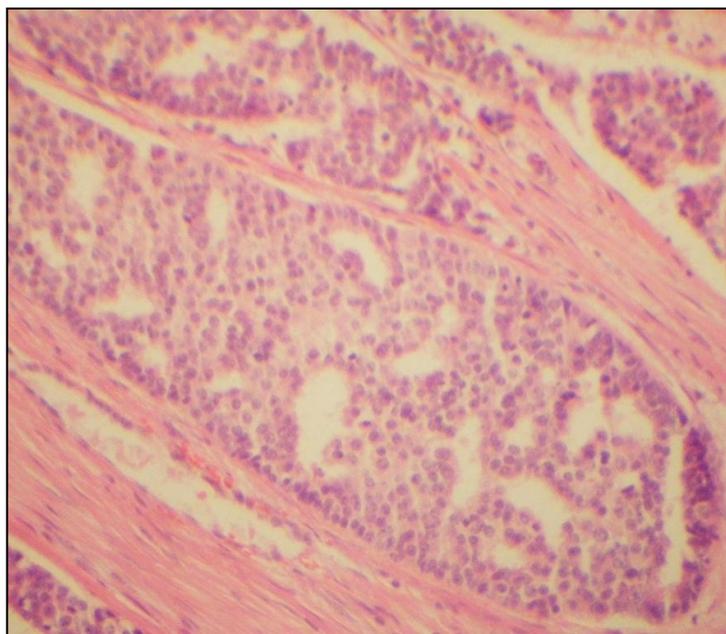


Figura 1: Corte histológico proveniente de carcinoma ductal invasivo de uma das amostras selecionadas (100X).

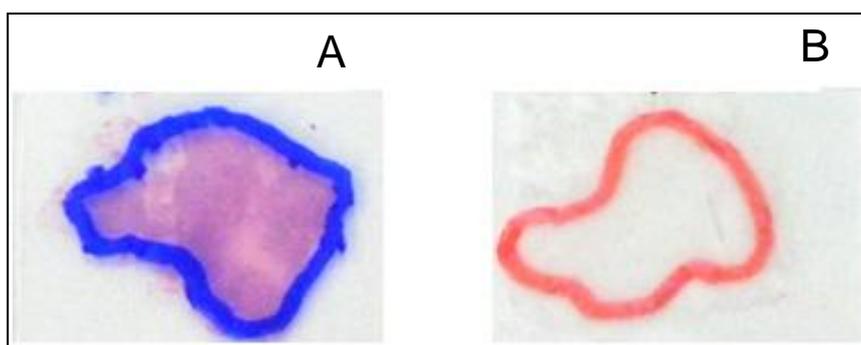


Figura 2: Lâmina com o corte histológico corado por Hematoxilina e Eosina demarcado em (A) e lâmina com o corte histológico sem coloração resultante do corte do bloco de parafina proveniente de carcinoma ductal invasivo (B).

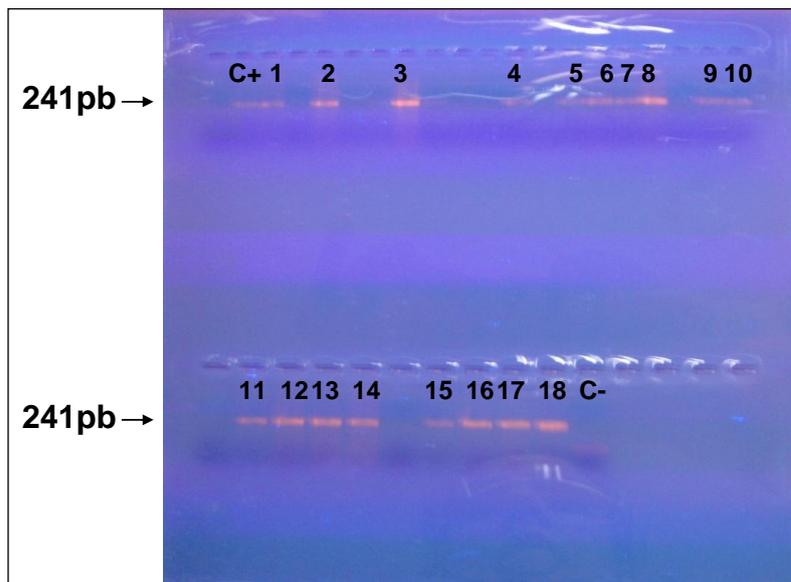


Figura 3: Gel de agarose a 3% com amplificação do gene CCR5 utilizando 3µL de volume de amostra extraída. Das 28 amostras do estudo, 18 foram positivas apresentando um fragmento de 241 pares de bases (pb). Na figura C+ corresponde ao controle positivo e C- ao controle negativo.

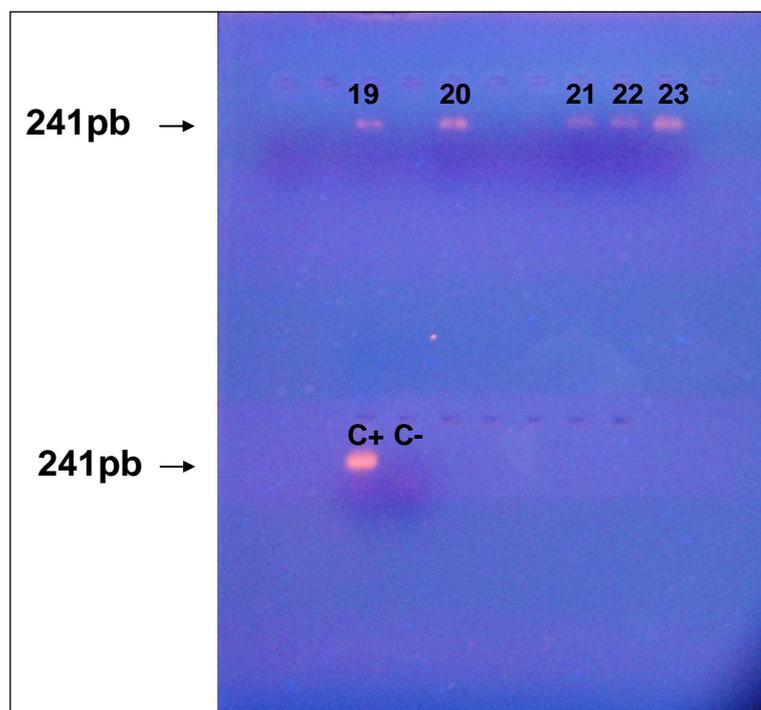


Figura 4: Gel de agarose a 3% com amplificação do gene CCR5 utilizando 5µL de volume de amostra extraída. 5 amostras (Números: 19, 20, 21, 22, 23) foram positivas apresentando um fragmento de 241 pares de bases (pb). Na figura C+ corresponde ao controle positivo e C- ao controle negativo.

DISCUSSÃO

A fixação de tecidos com formalína a 10% e incluídos em parafina é um método prático e eficiente para sua preservação, sendo, portanto, muito utilizado em anatomia patológica. Além da eficácia na prevenção, esse processo permite que possamos estudar essas amostras anos após a retirada da mesma e do seu diagnóstico estabelecido através da biópsia. Entretanto, esse tipo de fixação dificulta o processo de extração do DNA, no nosso caso, para estudo do DNA viral.

As nossas 28 amostras de DNA foram extraídas do material parafinado e um dos maiores inconvenientes deste procedimento foi o tempo que levamos para a extração das amostras, cerca de 4 horas, sendo que o material necessitava de agitações constantes para maximizar a lise do tecido.

SIMONATO et al., (2007), descreve que os principais obstáculos à obtenção de DNA a partir de material parafinado para a amplificação através da PCR, como exemplo do nosso trabalho, é a remoção da parafina e a purificação do DNA.

Mesmo sabendo da dificuldade para extração do DNA a partir do material parafinado, nosso controle realizado com o gene humano CCR-5 para avaliar o processo de extração, teve positividade de 82% das amostras indicando uma boa eficácia desse método.

A taxa de detecção do HPV no material parafinado é maior quando se utiliza os *primers* GP5 e GP6 e estes conseguem amplificar diferentes tipos do HPV já identificados (NICOLAU, 2005, p. 89).

Para a reação da PCR do HPV, mesmo padronizando a técnica com amostra HPV positiva e realizando combinações dos *primers* onde nosso resultado em relação ao *primers* de escolha está de acordo com a literatura (GP5 e GP6), não houve amplificação do HPV nas amostras estudadas.

Nosso trabalho corrobora com estudos da literatura, entretanto, diversos trabalhos relatam o oposto. Isto demonstra o quanto este tema é controverso ainda atualmente.

Estudos mostraram que o Papilomavírus Humano (HPV) podem imortalizar o epitélio mamário normal e isso levantou a possibilidade de que o HPV pode ser etiológicamente relacionado a alguns casos de câncer, inclusive o câncer de mama.

A associação do HPV com câncer de vários tipos, especialmente o câncer anogenital, está mais do que comprovado. Em todos estes cânceres a expressão das proteínas E6 e E7 fazem com que ocorra uma imortalização celular, isso fornece evidências de que os tipos de HPV de alto risco possam ter um papel na ocorrência do câncer, inclusive no câncer de mama. A interação entre HPV e os genes p53 e pRb também suporta o papel do HPV no presente processo (SILVA; AMARAL; CRUZ, 2002).

Inicialmente, no ano de 1992, Itália, foi realizado o primeiro estudo para análise do HPV em 40 amostras de mulheres com carcinoma de mama e nódulos linfáticos axilares metastáticos e não metastáticos, através da técnica de PCR com primers específicos para os tipos 11, 16 e 18 do HPV. A seqüência amplificada do DNA do HPV 16 foi encontrada em 29,4% dos carcinomas de mama e em 13,3% dos nódulos linfáticos metastáticos. Concluíram assim, que o HPV pode ocorrer em carcinomas de mama, embora menos freqüente que a neoplasia genital. Os dados tomados junto com a habilidade do HPV 16 de imortalizar as células epiteliais abrem à possibilidade de que esse vírus possa ser implicado na gênese do carcinoma mamário ductal (Di LONARDO, VENUTI, MARCANTE, 1992).

No mesmo ano de 1992 em Washington, foi realizado estudo para investigar a presença do DNA do HPV dos tipos 6, 11, 16 e 18 em 15 papilomas, 15 carcinomas papilares, e 13 carcinomas ductais infiltrantes da mama utilizando a PCR. Após

resultados, nenhuma seqüência de DNA do HPV foi identificado dos produtos de PCR. Concluíram que seja pouco provável que uma percentagem significativa dos carcinomas da mama humanos estejam etilogicamente relacionado com a infecção com um desses tipos de HPV (BRATTHAUER, TAVASSOLI, O'LEARY, 1992).

Já nesse momento é observado de acordo com os trabalhos mencionados acima a controvérsia dos achados relacionando o HPV e o câncer de mama.

YU et al., (2000), estudaram 32 casos de carcinoma ductal invasivo de mama de mulheres atendidas no hospital de Xangai. Utilizaram *primers* (G3PDHpF e GP3PDHpR). Os resultados obtidos relatam à presença do DNA do HPV 33 em 14 dos 32 casos (43,8%) no câncer de mama invasivo. Concluíram assim, que possa existir uma relação entre o HPV33 na gênese do câncer de mama. Chamaram a atenção para que esse achado possa ser um fator importante em termos de saúde publica não apenas na China, mas em todo o mundo.

No ano de 2004, EUA, estudo de 29 amostras de pacientes que foram submetidas à mastectomia de rotina, para pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama. Essas amostras eram dos mamilos (aréola) e do carcinoma de mama da mesma paciente, totalizando 29 pacientes. O material após preparo necessário foram submetidas à reação de PCR utilizando *primers* específicos (GP5 e GP6). Após amplificação através da PCR, encontrou nas seqüências analisadas 25 (86%) das amostras de carcinoma de mama e 20 (69%) das amostras de mamilo a presença do DNA do Papilomavírus Humano. Concluíram assim, que os dados apresentados em seus trabalhos demonstram a ocorrência de HPV em tecidos aréola e da mama em pacientes com carcinoma da mama (VILLERS, et al., 2005).

DAMIN et al., (2004), apresentou estudo com 101 amostras incluídas em parafina de carcinoma mamário que foram analisados através da PCR do período de junho de 2001 e julho de 2002. Vinte espécimes de mamoplastia redutora e 21 amostras de fibroadenomas foram estudados como um grupo controle não-malignas. Dois conjuntos diferentes de primers específicos visando à região E6 dos HPVs 16 e 18 foram utilizados para a análise. O DNA do HPV foi detectado em 25 carcinomas da mama (24,75%), mas em nenhuma das amostras benigna da mama. Dos 25 casos positivos, 14 foram HPV-16 positivo (56%) e 10 foram HPV-18 positivos (40%). Uma conclusão inicial foi à detecção do vírus HPV-16 e 18 em um único tumor (4%). Concluíram que os resultados que encontraram sugerem que a presença do HPV, qualquer dos tipos, HPV-16 ou 18 poderiam estar relacionados ao desenvolvimento do fenótipo maligno, sendo necessários mais estudos.

WIDSCHWENDTERA et al., (2004), realizou estudo com 11 pacientes apresentando histórico de câncer cervical associado ao câncer secundário de mama, cujos tecidos cervical, mamário e soro foram analisados por PCR para determinar a presença do DNA de HPV. Os resultados demonstraram a presença do HPV-16 em 6 pacientes, tanto no tecido cervical como no tecido mamário. Um dado importante é a presença do HPV-16 no tecido cervical, no tecido mamário e no soro, pois isto indica que o DNA do HPV pode ser transportado do sítio primário da infecção para o tecido mamário, através da corrente sanguínea.

GUMUS et al., (2006), realizou um estudo utilizando amostras alteradas e de tecido normal de 50 pacientes com câncer de mama. O DNA extraído dos tecidos foi amplificado por PCR utilizando primers de HPV. Os HPVs 11, 16, 18, 33 foram pesquisados em amostras de DNA-HPV positivo. Trinta e sete amostras (74%) do tecido mamário tumoral expressaram o DNA HPV e 16 amostras de tecido mamário normal (32%) foram positivas. Houve uma diferença significativa na positividade do DNA do HPV entre amostras normais e tumorais de mama. O HPV 18 foi detectado em 20 amostras positivas do tecido tumoral (54,4%) e em 9 de tecido normal (56,3%). HPV-33 também foi detectado em 35 (94,6%) do tecido tumoral e em 14 (87,5%) amostras de tecido normal. O DNA do HPV foi significativamente associado com tecido do tumor de mama

em comparação ao tecido mamário normal. Concluíram que estudos adicionais seriam necessários para esclarecer o papel etiológico do HPV no câncer de mama.

HENNIG et al., (1999), em trabalho realizado, utilizaram duas tecnologias diferentes, PCR e análise histológica. Seus resultados mostraram a presença do HPV de alto risco nas células das amostras do câncer da mama e em linhagens de células de câncer de mama. Além disso, mostraram também que as características do HPV oncogênico presentes no câncer de mama associado são muito semelhantes às associadas ao HPV do câncer cervical

GOPALKRISHNA et al., (1996), identificando que os resultados dos estudos do DNA do HPV em carcinomas de mama são considerados contraditórios, realizaram um estudo com células da mama obtidas com agulha fina aspirada de amostras de 26 pacientes com câncer de mama e quatro biópsias de tumores de mama. Realizaram análise para a presença de seqüências de DNA do HPV 16 e 18 pela técnica de PCR e hibridização Southern blot. Das 26 amostras de células com agulha fina aspirada e quatro biópsias de câncer de mama, não foi encontrado um único exemplar para ser positivo, com o DNA do HPV. Concluíram assim, que a observação da ausência do DNA do HPV no câncer de mama retira a possibilidade de qualquer papel do HPV na patogênese do câncer de mama.

No ano de 2007, foi realizado estudo com material parafinado de 81 pacientes com câncer de mama para pesquisa do DNA do HPV por PCR, utilizando os *primers* GP5 e GP6 que cobrem cerca de 40 diferentes tipos do HPV de baixo, médio e alto risco. Os resultados encontrados para todas as amostras realizadas foram negativos para a presença do DNA de HPV. Concluíram em análise que o papel do HPV não está relacionado à etiologia para o carcinoma da mama (LINDEL et al, 2007).

Em 2010, Brasil, estudo realizado observou a expressão do HPV por PCR onde analisaram 90 mulheres diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo de mama. O DNA extraído foi amplificado, quantificado e testados para os subtipos 6, 11, 16 e 18 por PCR. A pesquisa realizada em 79 amostras de DNA do HPV foi negativa para todas as mostras. Concluíram com o estudo realizado, que não há associação entre os tipos mais prevalentes do HPV e câncer de mama. (SILVA JR; SILVA, 2010).

Mesmo o número de amostras do trabalho de SILVA JR; SILVA, 2010, sendo maior que a desse trabalho, considerando que o grupo é o mesmo para carcinoma ductal invasivo, foi utilizado à técnica de PCR, nosso trabalho corrobora com os resultados encontrados por eles.

Em nosso trabalho adotamos uma metodologia similar utilizada em outros estudos em relação à detecção do HPV. Inclusive, testamos a combinação de diferentes primers para maximizar a amplificação genômica, entretanto, as nossas amostras deram negativas para o DNA viral.

Temos ciência que o número de amostras testadas poderia ser maior, contudo, acreditamos que o nosso achado fortalece o debate a respeito da ausência do DNA do HPV no câncer de mama.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Obtivemos êxito na extração do DNA a partir do material parafinado em 82% das amostras.

Nossos resultados estão de acordo com alguns estudos e não mostrou nenhuma evidência do DNA do HPV no carcinoma ductal invasivo da mama em um grupo de mulheres da Baixada Santista.

REFERÊNCIAS

BASSETT, L. W. et al. *Doenças da Mama*. Tradução Jane da Rocha e Vilma Ribeiro de Souza Varga. Revinter: Rio de Janeiro, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Controle do câncer de mama. Documento de consenso*. Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2004. 39 p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicacoes/Consensointegra.pdf>>. Acesso em: 01/10/2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer*. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>. Acesso em: 01/10/2010.

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Controle dos cânceres do colo do útero e da mama*. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/publicacoes/cadernos_ab/abcd13.pdf>. Acesso em: 10/09/2010.

BRATTHAUER, G. L.; TAVASSOLI, F. A.; O'LEARY, T. J. *Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18*. *Pathol Res Pract*. 1992 Apr;188(3):384-6. Department of Cellular Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320761>. Acesso em: 15/04/2010.

BRULE, A. J. van den, et al. *General primer polymerase chain reaction in combination with sequence analysis for identification of potentially novel human papillomavirus genotypes in cervical lesions*. *J Clin Microbiol*. 1992 July; 30(7): 1716–1721. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265369/>>. Acesso em: 12/09/2010.

CHUN-RU, H., et al. *Possible DNA Viral Factors of Human Breast Cancer*. *Cancers* 2010, 2, 498-512; doi:10.3390/cancers2020498. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/cancers>. Acesso em: 10/09/2010.

DAMIN, A. P. S., et al. *Evidence for an Association of Human Papillomavirus and Breast Carcinomas*. *Breast Cancer Research and Treatment*. v 84, Number 2 / March, 2004. 131-137 p. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999143>. Acesso em: 15/04/2010.

Di LONARDO, A.; VENUTI, A.; MARCANTE, M. L.. *Human papillomavirus in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;21(2):95-100. Regina Elena Institute for Cancer Research, CRS, Rome, Italy. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320958>>. Acesso em: 15/04/2010.

DORES, G. B. das. *Epidemiologia do HPV*. ROSENBLATT, C. et al. *HPV na Prática Clínica*. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 3.

GOPALKRISHNA, V. et al. *Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction*. *Breast cancer research and treatment*. 1996 v 39, n 2, Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/q117552283m1220x/fulltext.pdf>>. Acesso em: 10/07/2010.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. de M.; SILVA, G. A. e. *Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes*. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51(3): 227-234.

Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_51/v03/pdf/revisao1.pdf>. Acesso em: 12/09/2010.

GUMUS, M. et al. HPV DNA frequency and subset analysis in human breast cancer patients normal and tumoral tissue samples. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 25, 4, 2006. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310842>. Acesso em: 02/09/2010.

HENNIG, E. M. et al. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Research and Treatment* 53: 121-135, 1999. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/x6317k41484027m6/fulltext.pdf>>. Acesso em: 12/08/2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (ed.). *Patologia – Bases Patológicas das Doenças. Tradução de Maria da Conceição Zacharias et. al.* Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAWSON, J. S; DINH, T.; RAWLINSON, W. D. From Bittner to Barr: a viral, diet and hormone breast cancer aetiology hypothesis. *Breast Cancer Res* 2001, 3 : 81-85 doi:10.1186/bcr275. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/3/2/81>> Acesso em: 01/10/2010.

LEITE, R. C. ; OLIVEIRA, C. de; RIBEIRO, L. *Câncer de Mama: Prevenção e Tratamento.* São Paulo: Ediuoro, 2002.

LEÓN, D. C. de et al. Human Papillomavirus (HPV) in breast tumors: prevalence in a group of Mexican patients. Department of Surgical Oncology. Instituto Nacional de Cancerología, México City, México. *BMC Cancer* 2009. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/9/26>>. Acesso em: 10/09/2010.

LINDEL, K., et al. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *Breast.* 2007 Apr;16(2):172-7. Epub 2006. Disponível em: <[http://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776\(06\)00170-6/abstract](http://www.thebreastonline.com/article/S0960-9776(06)00170-6/abstract)>. Acesso em: 10/07/2010.

LOTSCH, P. F.; *Caracterização Molecular do Câncer de Mama em Mulheres Brasileiras: o papel dos genes TP53, MDM2 e XRCC1.* Tese de Doutorado-Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ, Instituto de Biologia, Rio de Janeiro, 2008.

MOTA, G. R.; *Avaliação da infecção e caracterização de tipos de papilomavírus humano (HPV) em gestantes infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).* Tese Doutorado – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias – São Paulo, 2002. 103, x.

PEREYRA, E. A. G.; PARELLADA, C. I. HPV nas mulheres. ROSENBLATT, C. et al. *HPV na Prática Clínica.* São Paulo: Atheneu, 2005, p. 59.

RAPAPORT, D. *Biologia do HPV.* ROSENBLATT, C. et al. *HPV na Prática Clínica.* São Paulo: Atheneu, 2005, p. 10.

REZENDE, W. W. *Tipos histológicos mais comuns.* Disponível em: <http://www.mamainfo.org.br/texto.asp?c=tipos_de_ca_de_mama>. Acesso em: 02/06/09.

SANTOS JÚNIOR, G. F. dos. *Deteção do Papilomavirus Humano em Sangue Periférico de Gestantes Portadoras do HIV-1* Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo - Escola

Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias São Paulo, 2005. 69 f.

SILVA R. G. Jr; SILVA B. B. da. No evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Aug 24. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20734131>> Acesso em: 12/09/2010.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; CRUZ, A. D. da C., HPV e Câncer: o papel do Papilomavírus na carcinogênese. *Revista Bio Tecnologia Ciência e Desenvolvimento.* Ano V. n 29. Dezembro/Janeiro 2002. Disponível em: <www.bioteχνologia.com.br/revista/bio29/hpv.pdf> Acesso em: 12/09/2010.

SIMONATO, L. E. et al. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinizado para amplificação em PCR. *J. Bras Patol Med lab.* V. 43. N 2, p 121-127 abril 2007.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B. ; CRUZ, A. D. da. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51(2): 155-160. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_51/v02/pdf/revisao2.pdf>. Acesso em: 12/09/2010.

VILLIERS, E. M. de, et al. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast *Breast Cancer Res* 2005, 7:R1-R11doi:10.1186/bcr940. Disponível em: <<http://breast-cancer-research.com/content/7/1/r1>>. Acesso em: 10/09/2010.

WIDSCHWENDTERA, A. et al. Detection of human papillomavirus DNA in breast cancer of patients with cervical cancer history. *Journal of clinical virology.* v 31, 4 ed., p 292-297, December 2004. Disponível em: <[http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532\(04\)00176-3/abstract](http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386-6532(04)00176-3/abstract)>. Acesso em: 02/09/2010.

YU, Y., et al. Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese. *Breast Cancer.* 2000 Jan;7(1):33-6. Department of Pathology, Shanghai First People's Hospital, China. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029768>. Acesso em: 15/04/2010.