



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATHÁLIA DE SOUSA PEREIRA

**VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO HUMANO (MMTV-*LIKE*):
CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE
MAMA**

Londrina
2019

NATHÁLIA DE SOUSA PEREIRA

**VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO HUMANO (MMTV-LIKE):
CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE
MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ebara Watanabe

Coorientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Pereira, Nathália.

Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV-*like*): correlação com prognóstico no câncer de mama / Nathália Pereira. - Londrina, 2019.
79 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Marla Karine Amarante.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2019.
Inclui bibliografia.

1. Tumor mamário - Tese. 2. HMTV - Tese. 3. Parâmetros clinico-patológicos - Tese. I. Ehara Watanabe, Maria Angelica. II. Amarante, Marla Karine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

NATHÁLIA DE SOUSA PEREIRA

**VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO HUMANO (MMTV-*LIKE*):
CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICO NO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara
Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Lígia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida e pela graça de conquistar mais uma etapa no percurso que escolhi para minha vida profissional. Sei que nada conseguiria se não fosse pelo Seu constante cuidado! Sou eternamente grata por sempre guiar os meus passos para o melhor caminho, mesmo que em inúmeras vezes os meus planos não tenham sido os Seus! Obrigada por fazer da constante frase *“Cuide das coisas de Deus, que Ele cuida das suas”* uma realidade na minha vida!

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe**, pela oportunidade maravilhosa de crescimento profissional que ela me concedeu há 6 anos atrás. Agradeço pela dedicação, pelos ensinamentos e por ser esse grande exemplo de profissional, o que me inspira todos os dias! Agradeço também por ter me acolhido nos momentos difíceis, me aconselhado e me incentivado a seguir batalhando pelo meu sonho! Sinto-me privilegiada por tê-la como orientadora!

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Marla Karine Amarante**, pelo voto de confiança ao me dar a chance de trabalhar neste projeto. Agradeço pela sua dedicação, pelos puxões de orelha, por todos os conselhos e por sempre me impulsionar a ser uma pessoa melhor! Obrigada por sempre ver o lado bom e divertido da vida! É uma honra estar ao seu lado e absorver todo conhecimento que você tem para passar!

À banca examinadora, **Profa. Dra. Lígia Carla Faccin Galhardi** e **Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata**, que generosamente aceitaram o convite para a avaliação e correção do presente trabalho, contribuindo com todo o seu conhecimento e experiência. Muito obrigada!

Aos amigos de laboratório: **Alberto Yoichi Sakaguchi**, **Carolina Batista Ariza**, **Caroline Yukari Motoori Fernandes**, **Carlos Eduardo Coral de Oliveira**, **Cintya Mayumi Ishibashi**, **Glauco Akelington Freire Vitiello**, **João Felipe Guapo Pasquini**, **Luiz Henrique Fernandes Spolador**, **Mariana de Oliveira Pinsetta**, **Matheus Dominato Munuera**, **Mayara Bocchi**, **Roberta Losi Guembarovski**, **Vânia Darc de Castro**; agradeço por serem parte da minha família científica, pelo companherismo, pela ajuda, pelos ensinamentos, pelas risadas e por escutarem todas as minhas reclamações!

Aos responsáveis por tudo isso: meus pais, **Nilcéia de Sousa e Luiz**

Fernando Gonçalves Pereira. Obrigada por serem o meu porto seguro, meu ponto de paz e de amor! Agradeço pelos imensos sacrifícios que vocês fizeram durante toda a minha vida, para que eu pudesse ter um futuro melhor! Obrigada por nunca colocarem meus sonhos em gaiolas, mas sim permitirem que eu abrisse as minhas asas e aprendesse a voar sozinha! Espero um dia poder retribuir tudo o que vocês fizeram por mim!

Ao restante da minha **família**, agradeço por sempre estarem presentes, apesar do tempo e da distância! Agradeço pela torcida, pelas orações e por sempre estarem de braços abertos para me receber de volta!

Aos meus **amigos**, que são verdadeiros presentes de Deus em minha vida, agradeço por me acolherem em seus corações nos momentos em que eu mais precisei. Agradeço por todo cuidado, pelo companheirismo, pelos momentos de alegria e de tristeza... Por tudo o que já passamos juntos! Vocês são essenciais para mim e jamais me esquecerei de vocês e de tudo o que fizeram! Obrigada por me aguentarem e por estarem tão presentes no meu dia-a-dia!

Às minhas amigas, **Carolina Garanhani e Mariana Mendonça**, pela amizade inestimável, pelos conselhos, por se alegrarem comigo em todas as minhas conquistas e por cederem o ombro para meus choros! Agradeço por aguentarem as minhas reclamações e os meus dramas. Sei que nem o tempo e nem a distância são capazes de destruir uma amizade abençoada por Deus! Agradeço simplesmente por serem as melhores amigas desse mundo! *“Uma por todas e todas por uma”!*

Às agências de fomento, **CAPES, CNPq e Fundação Araucária**, pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

À todas as **pacientes** que generosamente aceitaram participar desse estudo, acreditando na ciência e na esperança de dias melhores! Muito obrigada!

"Aliás, sabemos que todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são os eleitos, segundo os seus desígnios."
Romanos 8, 28.

PEREIRA, Nathália de Sousa. **Vírus do tumor mamário humano (MMTV-like): correlação com prognóstico no câncer de mama**. 2019. 79 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa cuja evolução depende da interação entre tumor e hospedeiro. Este tipo de câncer ocorre quando células mamárias benignas começam a se proliferar descontroladamente, e assim podem invadir tecidos adjacentes ou promover metástases. O vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV) tem sido sugerido como agente etiológico do câncer de mama murino. A identificação de uma sequência similar ao MMTV, chamada de MMTV-like ou vírus do tumor mamário humano (HMTV), tem suportado a teoria do envolvimento viral na patogênese do câncer de mama humano. No entanto, várias questões-chave ainda não estão claras, como o significado clínico de sua infecção e seu papel na patogênese do câncer de mama. Assim, este estudo teve como objetivo detectar a presença de DNA do HMTV em 216 amostras de tecidos de tumores mamários humanos e em 32 amostras de sangue periférico e correlacionar com os parâmetros clínico patológicos, tais como idade, tamanho tumoral, grau histológico, acometimento de linfonodos, entre outros. A sequência de 251pb referente ao gene *env* do HMTV foi obtida por *nested*-PCR e os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. O sequenciamento foi realizado para confirmar a amplificação do gene estudado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação de Tau-b de Kendall. A sequência viral foi verificada em 19,0% (n = 41) do tecido mamário tumoral e em 53,1% (n = 17) das amostras de sangue periférico. Em nosso estudo, não houve correlação significativa entre a presença do DNA viral e parâmetros clínico patológicos no câncer de mama geral e nem nos subtipos Luminal A e triplo negativo com os parâmetros clínico patológicos. Para o subtipo Luminal B, a presença do DNA do HMTV foi correlacionada a menor estadiamento TNM do câncer de mama ($\tau = -0,382$, $p = 0,042$). Mesma correlação foi observada no subtipo HER2-superexpresso ($\tau = -0,551$, $p = 0,001$), além de estar associada a ausência de acometimento de linfonodos neste subtipo molecular de câncer de mama ($\tau = -0,559$, $p = 0,015$). Em relação às amostras de sangue periférico, foi observada uma tendência de correlação entre a presença do DNA viral com menor idade ao diagnóstico ($\tau = -0,355$, $p = 0,053$) e com a ausência de comprometimento de linfonodos ($\tau = -0,400$, $p = 0,051$). Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais o vírus pode afetar o prognóstico das pacientes e participar da patogênese do câncer de mama, os resultados obtidos no presente estudo mostram pela primeira vez a presença de DNA do HMTV em amostra de tecido mamário tumoral e sangue periférico de pacientes brasileiras. Além disso, é a primeira vez que uma análise de correlação entre os parâmetros clínico patológicos e o DNA viral em subtipos moleculares de câncer de mama é realizada.

Palavras-chave: HMTV. Tumor mamário. DNA. Parâmetros clínico patológicos.

PEREIRA, Nathália de Sousa. **Human mammary tumor virus (HMTV): correlation with prognosis in breast cancer.** 2019. 79 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a heterogeneous and complex disease whose evolution depends on the interaction between tumor and host. This type of cancer occurs when benign mammary cells begin to proliferate wildly, and so can invade adjacent tissues or promote metastasis. The mouse mammary tumor virus (MMTV) has been suggested as an etiologic agent for the pathogenesis of murine BC. The identification of the sequence similar to MMTV, called MMTV-*like* or human mammary tumor virus (HMTV), has supported the theory of viral involvement in the pathogenesis of BC. However, several key issues remain unclear, such as the clinical significance of its infection and its role in the pathogenesis of BC. Thus, this study aimed to detect the presence of HMTV DNA in 216 tissue samples from human mammary tumor and in 32 peripheral blood samples and correlate with clinicopathological parameters such as age, tumor size, histological grade, lymph node involvement, among others. The 251bp sequence related to the HMTV env gene was obtained by nested-PCR and the products were submitted to electrophoresis on 10% polyacrylamide gel. Sequencing was performed to confirm the amplification of the studied gene. Statistical analyses were performed using Kendall Tau-b correlation coefficient. Viral sequence was verified in 19.0% (n=41) of BC tissue and in 53.1% (n=17) of peripheral blood samples. In our study, there was no significant correlation between the presence of viral DNA in general BC nor in Luminal A and triple negative subtypes with clinicopathological parameters. For the Luminal B subtype, the presence of HMTV DNA was associated with lower TNM staging of BC ($\tau = -0.382$, $p = 0.042$). Same correlation was observed in HER2 overexpression subtype ($\tau = -0.551$, $p = 0.001$), besides being associated with the absence of lymph nodes commitment in this molecular subtype of BC ($\tau = -0.559$, $p = 0.015$). In relation to the peripheral blood samples, a trend was observed in the correlation between the presence of viral DNA with lower age at diagnosis ($\tau = -0.355$, $p = 0.053$) and absence of lymph nodes commitment ($\tau = -0.400$, $p = 0.051$). Although more studies are needed to clarify the mechanisms by which the virus can affect the prognosis of patients and participate in the pathogenesis of BC, the results obtained in the present study show for the first time the presence of HMTV DNA in tumoral breast tissue sample and peripheral blood of Brazilian patients. In addition, it is the first time that a correlation analysis between clinicopathological parameters and viral DNA in molecular subtypes of BC is performed.

Keywords: HMTV. Mammary tumor. DNA. Clinicopathologic parameters.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura viral do Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV)	21
Figura 2 – Diagrama da estrutura do RNA viral do Vírus de Tumor Mamário de Camundongos (MMTV)	21
Figura 3 – Micrografia eletrônica do Vírus de Tumor Mamário de Camundongos (MMTV)	24
Figura 4 – Distribuição mundial da detecção do Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV) em amostras de câncer de mama	30
Figura 5 – Sítio de hibridização dos <i>primers</i> de <i>nested-PCR</i> para amplificação do gene <i>env</i> do Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase do câncer de mama	16
Tabela 2 – Subtipos moleculares do câncer de mama.	17
Tabela 3 – Presença de sequências gênicas do Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV) em pacientes com câncer de mama.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µL	Microlitro
AgNO ₃	Nitrato de Prata
APOBEC	<i>(Apolipoprotein B Mrna Editing Catalytic Polypeptide-Like)</i>
BRCA1	Gene do Câncer de Mama 1 <i>(Breast Cancer Gene 1)</i>
BRCA2	Gene do Câncer de Mama 2 <i>(Breast Cancer Gene 2)</i>
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos
CI	Carcinoma Invasivo
CM	Câncer De Mama
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribunucleico <i>(Deoxyribonucleic acid)</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados <i>(Deoxynucleotide)</i>
<i>env</i>	Envelope
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto <i>(Fibroblast Growth Factor)</i>
<i>gag</i>	Antígeno grupo-específico <i>(Group-specific antigen)</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HER2	Receptor Do Fator De Crescimento Epidermal Humano tipo 2 <i>(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)</i>
HERV	Retrovírus Endógenos Humano <i>(Human Endogenous Retroviruses)</i>
HMTV	Vírus do Tumor Mamário Humano <i>(Human Mammary Tumor Virus)</i>
HPV	Vírus do Papiloma Humano <i>(Human Papiloma Virus)</i>
HTLV	Vírus Linfotrópico da Célula T Humana
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
kb	Kilobase
KCl	Cloreto de Potássio
Ki-67	Índice de Proliferação Celular
LTR	Sequência Repetitiva Terminal Longa <i>(Long Tandem Repeat)</i>
MgCl ₂	Cloreto De Magnésio

MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MMTV	Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>)
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase Aberta de Leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	Par de Base (<i>Pair Base</i>)
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
pM	Picomolar
<i>pol</i>	Polimerase
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RP	Receptor de Progesterona
SAg	Superantígeno
TCR	Receptor de Célula T (<i>T Cell Receptor</i>)
TN	Tecido Normal
TNM	Sistema Tumor-Nódulo-Metástase
U	Unidade
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UICC	União Internacional de Controle ao Câncer
WNT	Via de sinalização WNT

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Câncer de mama feminino	13
1.2	Hipótese de etiologia viral para o câncer de mama.....	19
1.3	Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV)	20
1.4	Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV).....	23
2.	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo geral.....	33
2.2	Objetivos específicos.....	33
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	Seleção das amostras	34
3.2	Extração de DNA do tecido mamário e sangue periférico	34
3.3	Detecção da sequência gênica <i>env</i> do HMTV	34
3.4	Sequenciamento	36
3.5	Análise Estatística	36
4.	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	37
5.	CONCLUSÕES	59
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
7.	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS	74
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....	75
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer vem adquirindo relevância crescente, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, para o ano 2030, tenha 27 milhões de casos incidentes de câncer e 17 milhões de mortes por esta doença. Já a estimativa brasileira do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o biênio 2018-2019, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos de câncer para cada ano (INCA, 2017).

O câncer caracteriza-se pela proliferação desregulada de células e surge a partir de alterações essenciais na fisiologia celular, as quais, coletivamente, contribuem para o crescimento dos tumores malignos. Dentre as alterações essenciais podem ser citadas: suficiência em relação aos fatores de crescimento, insensibilidade aos inibidores de crescimento, evasão à morte celular programada, potencial ilimitado de replicação, angiogênese aumentada, invasão tecidual e disseminação à distância (metástase) (HANAHAN, D., 2000).

A etiologia desta doença é multifatorial e genética, no entanto não é, necessariamente, hereditária. Os cânceres humanos são, na sua maioria, originados de mutações somáticas resultantes de interações entre diversos fatores, a citar: microorganismos; agentes hormonais; genéticos; fatores ambientais e estilo de vida, por exemplo o tabagismo, o sedentarismo, a dieta, a obesidade, o alcoolismo e a exposição a radiação ionizante (PERERA, F. P., 1997).

Embora a célula tumoral represente o principal foco no desenvolvimento de uma neoplasia, é importante considerar que a massa tumoral não é composta apenas de células neoplásicas, mas de um conjunto de células tumorais e elementos não neoplásicos, tais como células mesenquimais e componentes dos sistemas imune e vascular, que contribuem substancialmente para a carcinogênese, progressão tumoral e metástase das células transformadas (KERKAR, S. P. e RESTIFO, N. P., 2012).

1.1 Câncer de mama feminino

O câncer de mama é um grave problema de saúde pública, considerando o número de mulheres que são diagnosticadas e de óbitos que

acontecem anualmente por esta doença. Para o ano de 2050, foi estimado cerca de 3,2 milhões de novos casos no mundo (HORTOBAGYI, G. N. *et al.*, 2005). No Brasil, a estimativa para cada ano do biênio de 2018-2019 é de cerca de 59.700 novos casos. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (73,07/100mil), Sudeste (69,50/100mil), Centro-Oeste (51,96/100mil) e Nordeste (40,36/ 100mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100mil), seguido apenas pelo câncer de colo de útero (INCA, 2017).

Apesar de ter um prognóstico relativamente bom, quando diagnosticado em estágios iniciais e tratado oportunamente, o câncer de mama é detectado em estágios mais avançados em países de baixa e média rendas, reduzindo significativamente a sobrevida das pacientes (INCA, 2017). Já em países altamente desenvolvidos, a incidência desse tipo de câncer tem diminuído desde a última década, devido a melhorias no rastreamento da população, levando ao aumento da detecção precoce, e a utilização de terapias mais eficazes (STEWART, B. e WILD, C. P., 2014).

O curso clínico do câncer de mama e a sobrevida variam para cada paciente e dependem de uma série de fatores. A idade é um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo a incidência maior em mulheres acima dos 40 anos de idade (SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. e JEMAL, A., 2017). Mulheres que apresentam um histórico familiar de câncer de mama, com 2 ou mais parentes de primeiro grau afetadas, apresentam 2,5 vezes mais risco de desenvolver a doença (BREWER, H. R. *et al.*, 2017). A suscetibilidade familiar pode ser atribuída a mutações em genes relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama, como os genes *BRCA1* e *BRCA2* (FRANCKEN, A. B. *et al.*, 2013). Os fatores reprodutivos também estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama, como menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia na primeira gravidez e nuliparidade (HORN, J. *et al.*, 2013). A terapia de reposição hormonal envolve a administração de estrogênio exógeno, o qual tem sido apontado como um fator de risco para o câncer de mama (BAN, K. A. e GODELLAS, C. V., 2014). O estilo de vida como o uso excessivo de álcool e dieta rica em gordura tem sido apontado como importantes fatores de risco nos últimos anos (JUNG, S. *et al.*, 2016; MAKAREM, N. *et al.*, 2013).

A doença metastática, caracterizada pela propagação das células tumorais através do corpo, é responsável pela maioria das mortes destes pacientes (REDIG, A. J. e MCALLISTER, S. S., 2013). O câncer de mama é caracterizado por um padrão metastático específico envolvendo linfonodos regionais, medula óssea, pulmão e fígado. A migração das células tumorais compartilham muitas semelhanças com o tráfego de leucócitos, o qual é regulado por citocinas, quimiocinas e seus receptores (MÜLLER, A. *et al.*, 2001).

Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o sítio de origem da neoplasia, dividindo-se em ductais e lobulares. Os ductais se desenvolvem nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores. Os lobulares desenvolvem-se no interior dos lóbulos e representam cerca de 10 a 15% dos casos. Outros subtipos raros representam menos de 10% dos casos diagnosticados por ano (VARGO-GOGOLA, T. e ROSEN, J. M., 2007).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos tumores malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), o qual leva em consideração a extensão anatômica da doença. Os tumores primários são classificados da seguinte maneira: T0 para os tumores não detectáveis, Tis para os carcinomas *in situ*, T1 para tumores de até 2cm, T2 para tumores de 2cm a 5cm, T3 para tumores maiores que 5cm e T4 para qualquer tamanho tumoral com extensão para a parede torácica e/ou pele. O acometimento de linfonodos é classificado conforme a cadeia de drenagem linfática comprometida, sendo N0 para ausência de metástases linfonodais, N1 para metástases em linfonodos axilares ipsilaterais móveis, N2 para metástases em linfonodos axilares ipsilaterais clinicamente fixos ou emaranhados e N3 para metástase em linfonodos infraclaviculares ipsilaterais com ou sem acometimento de linfonodos axilares. As metástases a distância são classificadas conforme a ausência (M0) ou presença (M1) de órgãos a distância acometidos. A avaliação desses parâmetros permite a classificação do estadiamento que variam de 0 a IV, conforme demonstra a Tabela 1 (BRIERLEY, J., GOSPODAROWICZ, M. K. e WITTEKIND, C., 2017).

Tabela 1 - Estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase do câncer de mama

Estadiamento	Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases à Distância (M)
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T0, T1	N1mi	M0
Estadio IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estadio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: BRIERLEY, J., GOSPODAROWICZ, M. K. e WITTEKIND, C. (2017).

N1mi: micrometástases entre 0,2mm e 2,0mm.

Uma classificação molecular dos carcinomas de mama estratificou os tumores em subgrupos de acordo com os perfis de expressão gênica, permitindo prever a evolução de alguns subtipos baseado em seu fenótipo molecular (SØRLIE, T. *et al.*, 2001). Os marcadores utilizados na rotina clínica são: os receptores de estrogênio (RE), os receptores de progesterona (RP), a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2) e o marcador do índice de proliferação celular Ki-67. O câncer de mama é então classificado em relação a presença ou ausência desses marcadores, sendo que tais subtipos conferem às pacientes diferenças significativas no prognóstico e na resposta terapêutica (RAKHA, E. A. *et al.*, 2010; WEIGELT, B., GEYER, F. C. e REIS-FILHO, J. S., 2010). A partir dos perfis de expressão gênica, foi, inicialmente, identificado quatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2 superexpresso e basaloide, como demonstrado na Tabela 2 (CIRQUEIRA, M. B. *et al.*, 2011; PEROU, C. M. *et al.*, 2000; SØRLIE, T. *et al.*, 2001).

Tabela 2 - Subtipos moleculares do câncer de mama.

Subtipo Molecular	Marcadores moleculares
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+ e HER2+ RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14%
HER2 superexpresso	RE-, RP- e HER2+
Basaloide ou <i>basal-like</i>	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basalóide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-
Claudina-baixa	RE-, RP-, HER2-, Claudina+ e E-caderina-

RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, HER2: receptor do fator de crescimento epidermal humano tipo 2, Ki-67: índice de proliferação celular, CK5: citoqueratina 5, EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal.

O subtipo Luminal A é o mais comum e corresponde a 50-60% de todos os tipos de câncer de mama. É caracterizado pela positividade para o RE e/ou RP, negatividade para a superexpressão do HER2 e índice de Ki-67 inferior a 14%. Pacientes diagnosticadas com câncer de mama Luminal A possuem melhor taxa de sobrevida quando comparadas a outros subtipos moleculares (CHEANG, M. C. U. *et al.*, 2009; PEROU, C. M. *et al.*, 2000; SØRLIE, T. *et al.*, 2001).

Os tumores de mama Luminal B têm sido caracterizados pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais e pela positividade para a superexpressão do HER2 (CHEANG, M. C. U. *et al.*, 2009). Alguns tumores não apresentam a positividade para a superexpressão do HER2, mas apresentam índice de proliferação celular superior a 14%, sendo assim classificados como Luminal B. Devido ao aumento de expressão de genes relacionados a proliferação celular, os tumores Luminais B são mais agressivos quando comparados ao Luminal A (SØRLIE, T. *et al.*, 2001).

As pacientes com câncer de mama que apresentam receptores de estrógeno positivos, como as Luminal A e Luminal B, fazem uso de antiestrogênicos, como tamoxifeno e inibidores de aromatase. O uso de antiestrogênicos reduzem a recorrência e a mortalidade das mulheres diagnosticadas com câncer de mama (CIRQUEIRA, M. B. *et al.*, 2011).

O subtipo HER2 superexpresso ou HER2 positivo corresponde a 20-30% de todos os tipos de câncer de mama diagnosticados e é caracterizado pela negatividade para expressão dos receptores hormonais mas há uma superexpressão do oncogene *HER2*. A superexpressão da oncoproteína HER2 é um fator prognóstico conhecido por estar associado a uma pior sobrevida em pacientes com câncer de mama (SØRLIE, T. *et al.*, 2001). Entretanto, a utilização de uma terapia alvo-específica, um anticorpo monoclonal humanizado denominado trastuzumabe, melhora o prognóstico dessas pacientes (WARD, S., PILGRIM, H. e HIND, D., 2009).

Os tumores de mama do tipo basaloide ou *basal-like* correspondem a 15% de todos os tipos de câncer de mama e são caracterizados pela alta expressão de genes correlacionados a proliferação celular e pela negatividade para expressão dos receptores hormonais e superexpressão do HER2, chamados de triplo-negativos. Os tumores *basal-like* são um subgrupo dos tumores de mama triplo-negativos que apresentam também um aumento de expressão de genes expressos por células basais e mioepiteliais, incluindo as citoqueratinas 5 e 14, caderinas e receptores de fator de crescimento epidermal. É o subtipo de comportamento clínico mais agressivo e de pior prognóstico, visto que as pacientes apresentam menor sobrevida livre de recorrência e menor tempo de sobrevida global (PROVENZANO, E., ULANER, G. A. e CHIN, S.-F., 2018; SØRLIE, T. *et al.*, 2001; VAN DE RIJN, M. *et al.*, 2002; VUONG, D. *et al.*, 2014).

A classificação mama-normal símile para os tumores mamários foi descartada por representar uma contaminação com glândulas normais. Isso porque esse subtipo apresenta expressão de genes expressos em células epiteliais normais, células adiposas e em outros tipos de células não-epiteliais. Estes tumores também apresentam alta expressão de genes de células basais e baixa expressão de genes de células luminais (PEROU, C. M. *et al.*, 2000; PROVENZANO, E., ULANER, G. A. e CHIN, S.-F., 2018; SØRLIE, T. *et al.*, 2001).

Outro subtipo molecular do câncer de mama foi identificado sendo denominado *claudin-low* ou claudina-baixa. Esse subtipo é caracterizado como triplo-negativo não basaloide, apresentando baixa expressão de genes envolvidos nas junções celulares, incluindo as claudinas 3, 4 e 7; as ocludinas e a E-caderina. Apresenta uma moderada expressão de genes de proliferação celular. Os

marcadores para sua caracterização estão sendo colocados, aos poucos, na prática clínica (CIRQUEIRA, M. B. *et al.*, 2011).

1.2 Hipótese de etiologia viral para o câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres em todo mundo, porém sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida. Variáveis como predisposição genética, idade e ambiente são comprovadamente fatores de risco, porém não são absolutos e únicos. Alguns vírus, devido a sua complexidade de estrutura e mecanismo de ação, são considerados agentes etiológicos de algumas neoplasias como o Vírus do Papiloma Humano (HPV) no câncer de colo de útero, Epstein-Barr em linfomas e o Vírus Linfotrópico de Células T Humana (HTLV) nas leucemias. Ainda, têm sido relatados outros vírus como indutores da carcinogênese, como por exemplo, o Vírus do Tumor Mamário de Camundongos (MMTV) (ETKIND, P. *et al.*, 2000).

Retrovírus são agentes etiológicos de algumas doenças como o câncer de mama. O ciclo replicativo desses vírus envolve um estágio obrigatório no qual o provírus (DNA dupla-fita) é inserido no genoma do hospedeiro, sendo esse processo permanente. Dependendo do sítio de integração e da orientação transcricional do provírus, as sequências presentes no DNA viral podem iniciar, aumentar e/ou terminar a transcrição de sequências gênicas do hospedeiro, resultando em altos níveis de RNA mensageiros codificando proteínas intactas ou produzindo transcritos aberrantes que codificam proteínas mutantes (JONKERS, J. e BERNS, A., 1996). Quando inserido em células germinativas, esse provírus pode ser transmitido para futuras gerações (LABAT, M. L., 1998).

O material genético de alguns vírus, podem ativar diversos tipos celulares envolvidos na imunidade e dirigir a produção de citocinas, como os interferons (IFNs) e interleucinas (Hochrein *et al.*, 2004; Hayashi *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2006; Takeuchi e Akira, 2009). A família IFNs do tipo I (IFN-alfa e -beta), possuem diversas funções na defesa antiviral, dentre elas a capacidade de limitar a propagação do vírus, de modular a resposta imune inata e de ativar o sistema imune adaptativo (DONNELLY, R. P. e KOTENKO, S. V., 2010). Os IFNs do tipo I podem induzir as enzimas da família da APOBEC, principalmente a APOBEC3, que possuem atividade citidina deaminase (STAVROU, S. e ROSS, S. R., 2015).

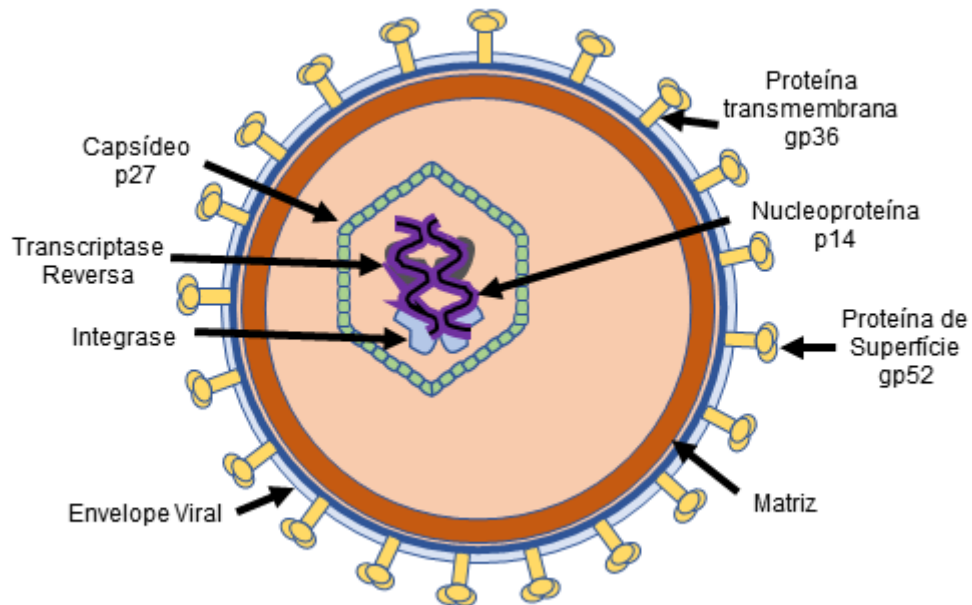
Diversos trabalhos demonstraram a presença de padrões de mutação consistentes com a atividade dessas enzimas no câncer de bexiga, no câncer de colo de útero, no câncer de pulmão, no câncer de cabeça e pescoço e no câncer de mama, com uma correlação entre a presença dessas mutações e a expressão de APOBEC3B (BURNS, M. B., TEMIZ, N. A. e HARRIS, R. S., 2013; ROBERTS, S. A. *et al.*, 2013). Além disso, a APOBEC3 demonstrou inibir infecções de MMTV e replicação viral em ratos (MACMILLAN, A. L., KOHLI, R. M. e ROSS, S. R., 2013; OKEOMA, C. M. *et al.*, 2010; OKEOMA, C. M. *et al.*, 2009).

1.3 Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV)

O Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV), pertencente à família *Betaretroviridae*, foi primeiramente relacionado como agente carcinogênico por BITTNER, J. J. (1936) como um filtrado extracromossomal que poderia ser transmitido de camundongos fêmeas infectadas aos filhotes durante o período de aleitamento. Este vírus, confirmado por microscopia eletrônica em 1948, é o agente etiológico mais comum de câncer de mama e linfomas de células T em ratos (LAWSON, J. S., GUNZBURG, W. H. e WHITAKER, N. J., 2006; LAWSON, J. S. *et al.*, 2006; MASON, A., 2000).

O vírion maduro (Figura 1) do MMTV apresenta 100nm de diâmetro, contendo duas cópias de simples fita de RNA associadas a uma ribonucleoproteína denominada p14, com simetria icosaédrica. As enzimas transcriptase reversa e integrase estão intimamente associadas as ribonucleoproteínas, que são circundadas pelas proteínas do capsídeo, a p27. O capsídeo do MMTV está ligado por proteínas da matriz ao envelope viral, que é uma porção da membrana plasmática da célula hospedeira modificada pela inserção de proteínas de superfície virais, como a gp52, e de proteínas transmembranas, como a gp36 (TERAMOTO, Y. A., CARDIFF, R. D. e LUND, J. K., 1977).

Figura 1 - Estrutura viral do Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV)



Fonte: o próprio autor

O RNA viral (Figura 2) possui regiões que codificam proteínas essenciais para a formação do vírion maduro, como a região *gag*, que codifica a protease viral, as proteínas do capsídeo e as nucleoproteínas, a região *gag-pol*, que codificam a transcriptase reversa e integrase, e a região *env*, que codifica as proteínas de superfície e transmembrana (ROSS, S. R., 2008; SZENTIVANYI, A. e FRIEDMAN, H., 2012). Além dessas regiões, o RNA do MMTV possui uma sequência repetitiva terminal longa (LTR), com aproximadamente 1.3kb. Isso porque essa região codifica uma proteína viral acessória, denominada de superantígeno (SAg), que é essencial para o ciclo replicativo do vírus (ROSS, S. R., 2010). O superantígeno é capaz de estimular grande quantidade de células T, através da ligação ao domínio variável da cadeia β do receptor de células T (TCR). Além disso, os superantígenos são apresentados por moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II (HERMAN, A. *et al.*, 1991).

Figura 2 - Diagrama da estrutura do RNA viral do Vírus de Tumor Mamário de Camundongos (MMTV)



Fonte: NARTEY, T. *et al.* (2014) modificado.

O MMTV pode ser transmitido de forma vertical, quando cópias endógenas do vírus encontram-se na linha germinativa e são herdadas, como qualquer outro gene; e de forma horizontal, na qual filhotes recém-nascidos são infectados através do leite da mãe, que é portadora do vírus (CZARNESKI, J. R., J. C.; ROSS, S. R., 2003). A transmissão vertical ou endógena ocorre quando o MMTV é transmitido para os descendentes como DNA proviral de maneira mendeliana. Algumas linhagens de camundongos apresentam o DNA proviral como um molde para a formação de partículas infecciosas. Em outras linhagens, a formação de mutações e deleções nos genes retrovirais endógenos impedem a formação das partículas virais e o desenvolvimento do câncer. De maneira geral, por conta das alterações genéticas no genoma viral, os provírus endógenos não codificam vírus funcionais (MASON, A., 2000; ROSS, S. R., 2008).

Quando ocorre a transmissão de forma exógena, através do leite, o vírus alcança as células M, presentes nas placas de Peyer, onde se encontram células dendríticas. A infecção se inicia com a ligação das proteínas do envelope a receptores celulares e se encerrando com a migração do DNA viral para o núcleo e integração no DNA do hospedeiro. As proteínas do envelope do MMTV se ligam aos receptores do tipo Toll 4 (TLR4) das células dendríticas, resultando na migração para o linfonodo. Após infectar as células dendríticas, o superantígeno é apresentado na superfície celular alocado na fenda da molécula de MHC classe II, ativando células T. Esses linfócitos T se proliferam, ativam as células B que produzem citocinas. Essas citocinas estimulam e recrutam células dendríticas, linfócitos B e T adicionais, estabelecendo assim um reservatório de células infectadas. A entrada do MMTV na célula também pode acontecer através do receptor de transferrina 1 (TfR1) (ROSS, S. R. *et al.*, 2002), o que pode explicar em partes a presença deste vírus em tecidos específicos, visto que células do sistema imune ativadas e células epiteliais mamárias em divisão apresentam altos níveis do TfR1 *in vivo* (FUTRAN, J. *et al.*, 1989; SCHULMAN, H. M. *et al.*, 1989). Assim sendo, os linfócitos infectados podem carregar o vírus para as glândulas mamárias, as quais se tornam infectadas com o MMTV durante a divisão celular, que ocorre por estimulação hormonal da puberdade e da gestação (ROSS, S. R., 2008). A infecção crônica das células mamárias induz a formação de tumores malignos (ACHA-ORBEA, H., SHAKHOV, A. N. e FINKE, D., 2007). Já os linfócitos T infectados

raramente se tornam tumorigênicos, mas quando isso ocorre há formação de linfomas de células T (YANAGAWA, S. *et al.*, 1993).

A expressão do provírus do MMTV é observada em células mamárias de camundongos fêmeas em lactação, refletindo uma resposta à elevação dos níveis hormonais circulantes, principalmente pela progesterona. No período anterior e posterior à lactação, não é detectável a transcrição do vírus (BOLANDER, F. F. e BLACKSTONE, M. E., 1990). Tal fato se deve a elementos responsivos hormonais presentes no gene LTR, que promovem a transcrição do genoma viral (MCGRATH, C. M. e JONES, R. F., 1978).

A propriedade de indução de tumor do MMTV está relacionada com um passo do ciclo replicativo dos retrovírus: inserção do DNA proviral no DNA do hospedeiro, podendo ativar assim um proto-oncogene. A maioria dos tumores de mama em camundongos possuem várias inserções do vírus, ativando diversos genes que podem cooperar para a tumorigênese (NUSSE, R., 1986). Atualmente, já foram identificados mais de 30 locais de integração proviral para MMTV endógeno (SZABO, S., HAISLIP, A. M. e GARRY, R. F., 2005). Os oncogenes ativados pelo vírus parecem ter papel principal no desenvolvimento normal, como, por exemplo, genes *Wnt* e genes de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (LABAT, M. L., 1998).

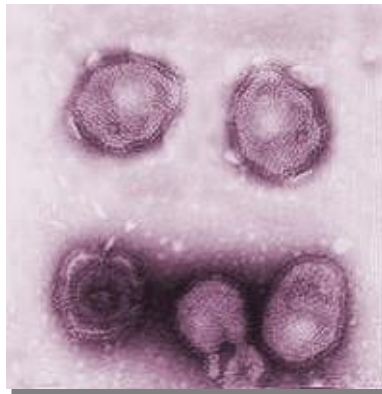
Desde a descoberta do MMTV, diversos grupos de pesquisa têm procurado por um vírus similar em câncer de mama humano. Alguns estudos indicaram que o vírus similar ao MMTV, denominado MMTV-*like* e também conhecido como vírus do tumor mamário humano (HMTV), pode ser um fator de risco para o câncer de mama humano (DELIGDISCH, L. *et al.*, 2013; MELANA, S. M. *et al.*, 2010).

1.4 Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV)

O possível papel do HMTV no câncer de mama humano permanece controverso. Estudos mais recentes reportando uma associação entre o vírus e o câncer de mama vem de um grupo de pesquisa dos Estados Unidos (MELANA, S. M. *et al.*, 2002; WANG, Y. *et al.*, 1998; WANG, Y. *et al.*, 1995; WANG, Y. *et al.*, 2001c), incluindo a identificação de duas sequências pró-virais completas presentes em tecido mamário tumoral (LIU, B. *et al.*, 2001). Partículas virais (Figura 3) foram

isoladas de culturas de células do câncer de mama humano e foram caracterizadas como uma estrutura proviral 95% homóloga ao MMTV, revelando características de um vírus em fase de replicação (MELANA, S. M. *et al.*, 2007). Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores demonstraram que células de tumor de mama humano produzem partículas virais do HMTV, similares ao vírus de ratos, e que estas sequências podem desempenhar um papel relevante para a patogênese do câncer de mama humano (MELANA, S. M. *et al.*, 2010). Além disso, as LTR contendo o gene do superantígeno do MMTV foi identificada por sequenciamento em amostras de câncer de mama humano, sendo altamente homóloga a presente no HMTV (WANG, Y. *et al.*, 2004).

Figura 3 - Micrografia eletrônica do Vírus de Tumor Mamário de Camundongos (MMTV)



Fonte: MELANA, S. M. *et al.* (2007)

A hipótese de que um retrovírus homólogo ao vírus MMTV está envolvido na etiologia do câncer de mama humano tem fascinado cientistas há muitos anos, mas nunca foi demonstrada de forma convincente. O interesse nesta hipótese foi renovado quando uma sequência semelhante ao gene *env* do MMTV foi encontrado em tecidos tumorais de mama de 38% das pacientes (ZAMMARCHI, F. *et al.*, 2006). A sequência gênica *env* do HMTV é representado por uma fase aberta de leitura (ORF) de aproximadamente 1,6kb, sendo 94-99% idêntico ao gene *env* do MMTV e, quando presente nas amostras analisadas, indica a presença do vírus (MOK, M. T. S. *et al.*, 2008). Esta sequência foi encontrada em proporções variáveis nas populações, variando entre 0 a 74% dos casos, mas raramente em tecidos normais (HACHANA, M. *et al.*, 2008) (Tabela 3).

Tabela 3 – Presença de sequências gênicas do Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV) em pacientes com câncer de mama.

País	Amostras	Resultados	Autor/Ano
Arábia Saudita	Tecido (parafina) n= 101	Presença do gene <i>env</i> em 5,9% das amostras	AL DOSSARY, R., ALKHARSAH, K. R. e KUSSAIBI, H. (2018)
Argentina	Tecido n= 74	Presença do gene <i>env</i> em 31% das amostras	MELANA, S. M. <i>et al.</i> (2002)
	Tecido (parafina) n= 45	Presença de sequência <i>env</i> em 42,2% das amostras	FORD, C. E. <i>et al.</i> (2003)
	Tecido (parafina) n= 128	Presença do gene <i>env</i> em 40% das amostras	FAEDO, M. <i>et al.</i> (2004)
	Tecido (parafina) n= 51 CDI e 2 CDIS	Gene <i>env</i> do HMTV foi detectado em 78% amostras CDI e 100% amostras CDIS	FORD, C. E., FAEDO, M. e RAWLINSON, W. D. (2004)
Austrália	Tecido (parafina) n= 20 CDI e 22 CDIS	Gene <i>env</i> do HMTV foi detectado em 75% amostras CDI e 23% amostras CDIS	LAWSON, J. S. <i>et al.</i> (2004)
	Tecido (parafina) n= 59	Presença do gene <i>env</i> em 37,3% amostras	LAWSON, J. S. <i>et al.</i> (2006)
	Tecido (parafina) n= 25	Presença do gene <i>env</i> em 36% das amostras	NARTEY, T. <i>et al.</i> (2017)
	Tecido (parafina) n= 45	Presença do gene <i>env</i> em 27% das amostras	LAWSON, J. S. <i>et al.</i> (2018)
Canadá	Tecido (parafina) n= 12	Genes <i>env</i> e <i>LTR</i> do HMTV em 50% das amostras	ETKIND, P. R. <i>et al.</i> (2004)
China	Tecido n= 131	Presença do gene <i>env</i> em 16,8% das amostras	LUO, T. <i>et al.</i> (2006)
Estados Unidos	Tecido (fresco e congelado) n= 314	Presença do gene <i>env</i> em 38,5% das amostras	WANG, Y. <i>et al.</i> (1995)
	Tecido (congelado) n= 73	Presença do gene <i>env</i> em 37% das amostras	ETKIND, P. <i>et al.</i> (2000)

	Tecido (parafina e congelado) n= 495	Presença do gene <i>env</i> em 38% das amostras	WANG, Y. <i>et al.</i> (2001b)
	Tecido (parafina) n= 106	Presença do gene <i>env</i> em 30,1% das amostras	MELANA, S. M., HOLLAND, J. F. e POGO, B. G. (2001)
	Tecido (congelado) n= 65	Presença do gene <i>LTR</i> em 41,5% das amostras	WANG, Y. <i>et al.</i> (2001a)
	Tecido (parafina e congelado) n= 29	Gene <i>env</i> do HMTV foi encontrado em 62% amostras de câncer de mama gestacional	WANG, Y. <i>et al.</i> (2003)
	Tecido n= 60	Presença do gene <i>env</i> em 71,5% das amostras	POGO, B. G., HOLLAND, J. F. e LEVINE, P. H. (2010)
Irã	Tecido (parafina) n= 59	Presença do gene <i>env</i> em 32,2% das amostras	SHARIATPANAHI, S. <i>et al.</i> (2017)
Israel	Tecido (parafina) n= 204	Antígeno para proteína do envelope gp52 do HMTV foi detectado em 62,7% das amostras	KEYDAR, I. <i>et al.</i> (1982)
	Tecido (parafina) n= 69	Presença do gene <i>env</i> em 37,7% das amostras	POGO, B. G. <i>et al.</i> (1999)
Itália	Tecido (congelado) n= 45	Presença do gene <i>env</i> em 33% das amostras	ZAMMARCHI, F. <i>et al.</i> (2006)
	Tecido (parafina) n= 49 CDIS e 20 CDI	Sequências <i>env</i> do HMTV foram encontradas em 82% de CDIS e em 35% de CDI	MAZZANTI, C. M. <i>et al.</i> (2011)
Marrocos	Tecido (parafina) n= 42	Presença do gene <i>env</i> em 57,14% das amostras	SLAOUI, M. <i>et al.</i> (2014)
México	Tecido (congelado) n= 458	12,4% amostras foram positivas para gene <i>env</i> do HMTV	CEDRO-TANDA, A. <i>et al.</i> (2014)

Myanmar	Tecido (parafina) n= 58	Presença da sequência do gene <i>env</i> do HMTV em 1,7% das amostras	SAN, T. H. <i>et al.</i> (2017)
Paquistão	Tecido (parafina) n= 80	Presença do gene <i>env</i> em 20% e LTR em 26% das amostras	NAUSHAD, W. <i>et al.</i> (2014)
	Tecido (parafina) n= 250	Presença das sequências gênicas do LTR e <i>env</i> em 29,3% das amostras	NAUSHAD, W., SURRIYA, O. e SADIA, H. (2017)
Tunísia	Tecido (parafina) n= 38	Presença do gene <i>env</i> em 73,7% das amostras	LEVINE, P. H. <i>et al.</i> (2004)
	Tecido (congelado) n= 122	Presença do gene <i>env</i> em 13,9% das amostras	HACHANA, M. <i>et al.</i> (2008)
Vietnã	Tecido (parafina) n= 120	A sequência <i>env</i> do HMTV foi encontrada em 0,8% das amostras	FORD, C. E. <i>et al.</i> (2003)

CDIS: carcinoma ductal *in situ*; CDI: carcinoma ductal invasivo; CI: carcinoma invasivo.

Além de amostras de tumor de mama, as sequências do HMTV também foram detectadas em outros materiais biológicos humanos. MELANA, S. M. *et al.* (2007) detectaram partículas do HMTV, por microscopia eletrônica, em culturas de células primárias isoladas de ascites ou efusões pleurais de pacientes com câncer de mama metastático. No trabalho de TOMANA, M. *et al.* (1981), soro de pacientes foram analisados, por imunofluorescência indireta, para a presença de anticorpos contra antígenos gp52 e gp34 do HMTV e foi encontrada reação positiva em pacientes com carcinoma mamário (40,9%), com tumores benignos da mama (18,5%), outros tipos de malignidades mamárias (11,7%) e mulheres livres de neoplasia controladas (3,6%). MAZZANTI, C. M. *et al.* (2015) encontraram presença de sequências gênicas do HMTV em saliva de humanos adultos, de crianças e pacientes com câncer de mama.

Um estudo de JOHAL, H. *et al.* (2011) verificou a presença da sequência do gene *env* do HMTV em amostras de leite de lactantes saudáveis. Em outro estudo investigando a presença do vírus em leite humano, esta sequência foi detectada em lactantes com histórico de biópsias mamárias e em mulheres que não passaram por biópsia. As sequências de RNA correspondentes ao gene *env* e a junção *env/LTR* foram encontradas, implicando na presença de partículas virais do HMTV no leite (NARTEY, T. *et al.*, 2014).

A rota de transmissão deste vírus em humanos ainda não está bem estabelecida. NARTEY, T. *et al.* (2014) detectaram DNA viral do HMTV em amostras de leite de mulheres lactantes que apresentaram alto risco de desenvolvimento do câncer de mama por terem feito, em algum momento da vida, biópsia mamária, dando suporte à hipótese de transmissão exógena, assim como ocorre nos camundongos. Já STEWART, T. H. M. *et al.* (2000) descobriram que uma maior incidência de câncer de mama ocorre em regiões onde a espécie de camundongo *Mus domesticus*, que abriga maior carga viral do MMTV, está presente, propondo que os seres humanos adquirem o vírus de camundongos. Outro estudo aponta a hipótese de gatos, infectados por MMTV de camundongos, transmitirem um vírus adaptado aos humanos. Nesta hipótese, gatos adquirem o vírus por via oral, ao se alimentarem de camundongos que abrigam cepas infecciosas de MMTV; e os humanos podem ser infectados por seu animal de estimação, entrando em contato com secreções, como a saliva de forma direta ou de forma indireta (SZABO, S., HAISLIP, A. M. e GARRY, R. F., 2005). HSU, W. L. *et al.* (2010) encontraram a presença das sequências gênicas *env* e *LTR* em tumores mamários malignos de cães e gatos, demonstrando que os animais de companhia que mantem contato diário com os humanos podem contribuir para a transmissão viral.

Além disso, a hipótese etiológica do câncer de mama humano pelo MMTV foi explorada e caracterizada no estudo realizado por ETKIND, P. R., STEWART, A. F. R. e WIERNIK, P. H. (2008), no qual três membros de uma mesma família, pai, mãe e filha, foram diagnosticados com carcinoma de mama metastático para os linfonodos axilares, sugerindo a possibilidade de um agente ambiental como fator etiológico comum. De fato, foram detectadas sequências semelhantes à proteína *env* e uma sequência *LTR*, contendo o gene do superantígeno do MMTV, nos tecidos malignos dos três indivíduos. As sequências amplificadas do gene *env* foram 98,0-99,6% homólogas as sequências *env* do MMTV encontradas nas linhagens murinas GR, C3H e BR6. Relatos de um possível agente causal desempenhando um papel importante na tumorigênese em cônjuges têm sido sugeridos por mais de 30 anos (LYNCH, H. T., SCHUELKE, G. S. e O'HARA, M. K., 1984).

Em um estudo de NARTEY, T. *et al.* (2017), a sequência de DNA correspondente ao gene *env* do HMTV foi identificada em 5 lesões benignas de mama coletadas entre 1 a 11 anos antes do diagnóstico do câncer de mama. As

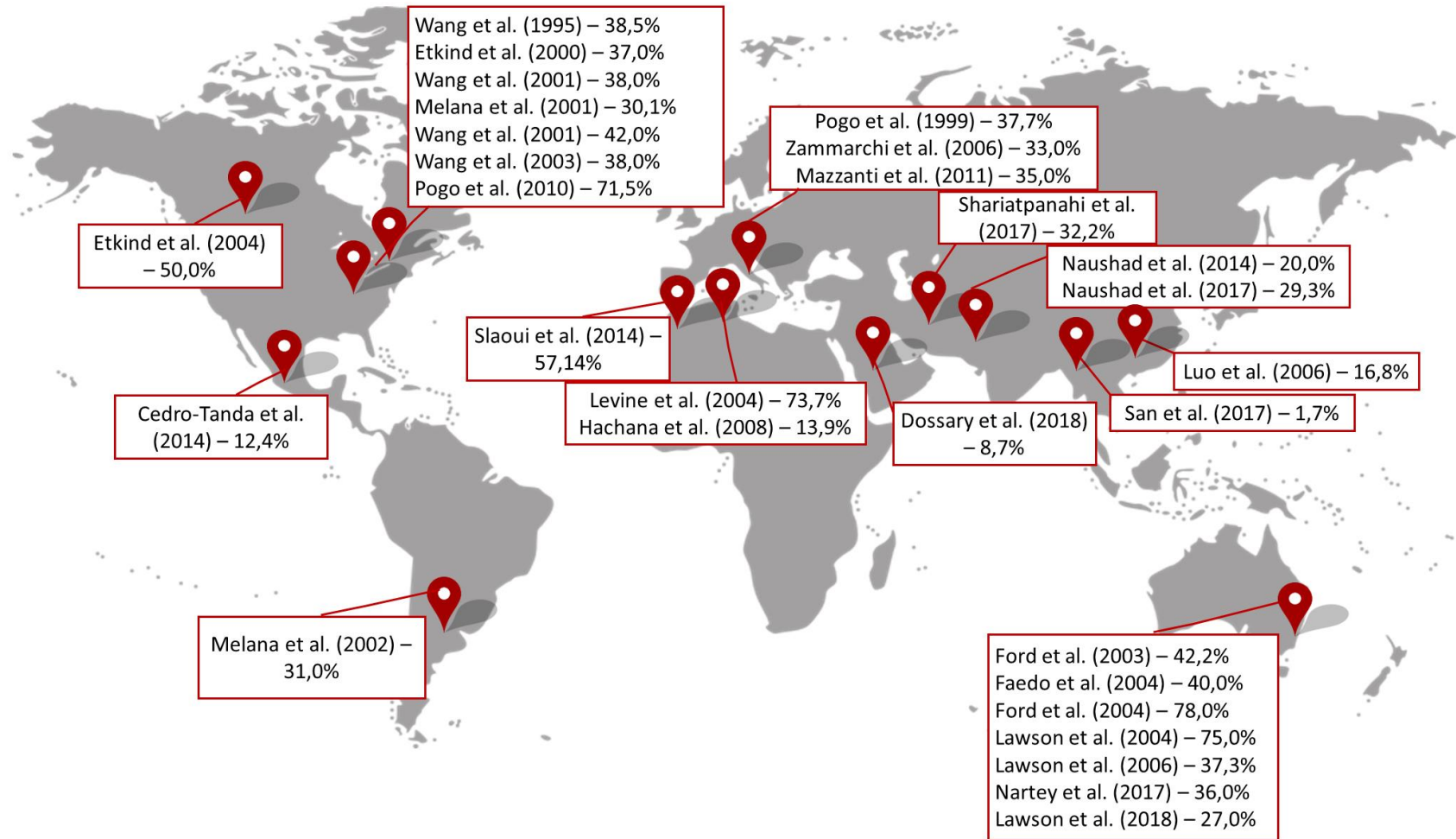
amostras de tecido mamário tumoral também foram consideradas positivas para a sequência gênica do HMTV. Tal estudo reforça a associação entre o vírus HMTV e o câncer de mama humano.

Um estudo com pacientes austríacas com câncer de mama não encontrou a sequência correspondente ao gene *env* em 50 amostras de DNA de tecido mamário tumoral humano, nem em 22 linhagens celulares, incluindo MCF-7, que foi previamente descrita como controle positivo nas reações em cadeia da polimerase (PCR) (WITT, A. *et al.*, 2003). BINDRA, A. *et al.* (2007) tentaram por PCR quantitativa em tempo real encontrar o vírus em amostras de 18 pacientes suecas com câncer de mama e 11 controles livres de malignidade, bem como amostras de sangue periférico das mesmas pacientes, e nenhuma das amostras foram positivas para o DNA ou RNA do HMTV. Resultados similares foram encontrados em outras populações, como na japonesa (FUKUOKA, H. *et al.*, 2008), na alemã (FRANK, O. *et al.*, 2008), na iraniana (AHANGAR OSKOUEE, M. *et al.*, 2014; TABRIZ, H. M. *et al.*, 2013) e na mexicana (MORALES-SANCHEZ, A. *et al.*, 2013).

Em um trabalho realizado com mulheres australianas, 42 amostras de tecido tumoral incluídas em parafina foram utilizadas para detectar a sequência *env* do HMTV, sendo que nenhuma amostra foi positiva para a presença desta sequência gênica (PARK, D. J. *et al.*, 2011). Tais achados parecem inconsistentes com resultados prévios de amostras da população australiana (FORD, C. E., FAEDO, M. e RAWLINSON, W. D., 2004; FORD, C. E. *et al.*, 2003; LAWSON, J. S. *et al.*, 2006; NARTEY, T. *et al.*, 2017) mas consistentes com o número crescente de trabalhos internacionais cujos resultados foram negativos para a presença do vírus em amostras de tecido tumoral mamário.

Uma possível explicação para os resultados divergentes presentes na literatura pode ser resultado de variações naturais da prevalência da infecção viral entre as diferentes populações (Figura 4). Discrepâncias também podem decorrer do uso de diferentes técnicas para a detecção viral, da variação nos procedimentos experimentais, das espécimes biológicas empregadas, da qualidade das amostras e do fato da sequência *env* estar presente em pouco número de cópias (MAZZANTI, C. M. *et al.*, 2011).

1 **Figura 4 - Distribuição mundial da detecção do Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV) em amostras de câncer de mama**



2 **Fonte:** o próprio autor

Resultados que mostram a ligação entre MMTV e o câncer de mama foram questionados por achados de sequências de retrovírus endógenas no genoma humano (HERVs) que possuem certa similaridade com a sequência do MMTV, particularmente com o gene *env*, que é o alvo das técnicas de PCR para detecção viral (ONO, M. *et al.*, 1986). HERVs são remanescentes de uma infecção retroviral em células germinativas, o que compõe cerca de 4,7% do genoma humano, e podem estar relacionados a patogênese de alguns tipos de câncer, como melanoma (LI, Z. *et al.*, 2010), câncer de ovário (WANG-JOHANNING, F. *et al.*, 2007), entre outros. Entretanto, por mais que alguns retrovírus endógenos sejam competentes em alguns roedores (como MMTV), nenhum HERV mostrou potencial infeccioso, visto que alguns deles apresentam ORF degradada devido a ação de alguns fatores de restrição, como as enzimas da família da APOBEC, e não são capazes de produzir vírions completos (HOHN, O., HANKE, K. e BANNERT, N., 2013; KASSIOTIS, G., 2014).

Tem sido demonstrado que diferenças entre as sequências do MMTV e HERV são suficientes para distinguir ambas usando as técnicas mais recentes de PCR (MANT, C. *et al.*, 2004; MASON, A. L., GILADY, S. Y. e MACKEY, J. R., 2011). Além disso, a identificação da sequência inteira do provírus que é 95% homóloga ao MMTV, mas somente 57% homóloga aos retrovírus endógenos reforça a ideia de utilização de *primers* específicos capazes de detectar as sequências gênicas correspondente ao HMTV (LIU, B. *et al.*, 2001). Comparações semelhantes foram realizadas por WANG, Y. *et al.* (2001c), obtendo uma homologia de 54% entre as sequências HMTV presentes nas amostras humanas e a sequência do HERV-K10, que é considerado o protótipo de sequências endógenas com similaridade ao MMTV.

O paralelo entre o tecido mamário humano e murino e o câncer de mama tem sido outro ponto de intenso debate na literatura (FINKE, D., LUTHER, S. A. e ACHA-ORBEA, H., 2002; MANT, C. e CASON, J., 2005; MASON, A. L., GILADY, S. Y. e MACKEY, J. R., 2011). Entretanto, estudos tem demonstrado que tumores humanos positivos para HMTV são histologicamente similares aos cânceres de mama MMTV positivos em camundongos (LAWSON, J. S. *et al.*, 2018; LAWSON, J. S. *et al.*, 2017; LAWSON, J. S. *et al.*, 2006).

Desta forma, a presença do HMTV no câncer de mama vem sendo evidenciado em muitos estudos. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados

para esclarecer seu papel como possível agente etiológico no câncer de mama e seu papel no prognóstico de pacientes diagnosticadas com este carcinoma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a presença do DNA do vírus HMTV em pacientes com câncer de mama da região norte do Paraná.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença do DNA do gene *env* do vírus HMTV em amostras de tecido tumoral mamário e sangue periférico das pacientes diagnosticadas com câncer de mama atendidas no Hospital do Câncer de Londrina.
- Correlacionar a presença do DNA do HMTV com os parâmetros clinicopatológicos (idade, tamanho tumoral, estadiamento TNM, grau histológico, acometimento de linfonodos, status do receptor de progesterona, status do receptor de estrógeno, superexpressão do HER2, status de Ki-67 e status de p53) das pacientes analisadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção das amostras

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil (CEP/UEL 189/2013), estando de acordo com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP-CAAE 47709015.2.0000.5231) e a Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo A). O convite às pacientes com diagnóstico de câncer de mama para participarem deste projeto de pesquisa ocorreu durante o atendimento clínico das mesmas nos serviços especializados e no Hospital do Câncer de Londrina. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todas as doadoras antes das coletas (Anexo B).

Foram obtidas 216 amostras de tecido mamário tumoral e 32 amostras de sangue periférico das mesmas pacientes, que foram submetidas a mastectomia no Hospital do Câncer de Londrina, Paraná, Brasil. O estadiamento clínico foi determinado de acordo com a União Internacional de Controle dos Critérios de Classificação do Câncer (UICC) (BRIERLEY, J., GOSPODAROWICZ, M. K. e WITTEKIND, C., 2017). A análise imunohistoquímica para os marcadores HER2, RE, RP, p53 e Ki-67 foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital do Câncer de Londrina, seguindo protocolo padrão (HAMMOND, M. E. *et al.*, 2010; WOLFF, A. C. *et al.*, 2013).

3.2 Extração de DNA do tecido mamário e sangue periférico

O DNA genômico foi obtido a partir das células do tecido mamário tumoral e do sangue periférico, através do método *salting-out* (KIRBY, L. T., 1990). As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop ND-2000c (Thermo Scientific, EUA) a 260nm e ajustadas para concentração de 200ng/ μ L.

3.3 Detecção da sequência gênica *env* do HMTV

O produto de PCR referente ao gene *env* do HMTV foi obtido através do *nested*-PCR, utilizando quatro oligonucleotídeos, como descrito por NARTEY, T.

et al. (2014), de acordo com a sequência depositada no GenBank (Accession Number KJ831810) (Figura 5).

Figura 5 – Sítio de hibridização dos *primers* de *nested-PCR* para amplificação do gene *env* do Vírus do Tumor Mamário Humano (HMTV)

<i>Primer</i>	Sequência	Tamanho do Fragmento (pb)
HMTV 1	5'-CCAGATCGCCTTTAAGAAGG-3'	595pb
HMTV 4	5'-TACAGGTAGCAGCACATATG-3'	
HMTV 2	5'-ACTGCACTAGTCCCCCATA-3'	251pb
HMTV 3	5'-ATCGCTGCATAGTCGTAGGC-3'	

TCTTTGACCTTATTTCTTGCTTTGTTGTCTGTCCCTCGGCCCCCCCGCTGTGACAGGGGAGAGTTATTGGG
 CCTACCTACCTAAACCACCTATTCTCCATCCCGTGGGATGGGGAAGTACAGACCCCATAGAGTTCTGAC
 AAATCAAACCATGTATTTGGGTGGTTTCGCCTGACTTTTCATGGGTTTCAGAAATATGTCTGGTAATGTACAT
 TTTGAGGGGAAGTCTGATACGCTCCCCATTTGCCTTTCTTTCTCCTTTTCTACCCCCACGGGCTGCTTTC
 AAGTAGACAAGCAAGTATTTCTTTCTGATACACCCACGGTTGATAATAATAAACCTGGGGGAAAGGGTGA
 TAAAAGGCGTATGTGGGAACCTTTGGTTGACTACCTTGGGGAACCTCAGGGGCCAATACAAAACCTGGTCCCT
 ATAAAAAGAAGTTGCCCCCCAAATATCCTCACTG**CCAGATCGCCTTTAAGAAGG**ACGCCTTCTGGGAGG
 GAGACGAGTCTGCTCCTCCACGGTGGTTGCCTTGCCTTCCCTGACCAGGGGGTGAGTTTTTCTCCAAA
 AGGGGCCCTTGGGTTACTTTGGGATTTCTCCCTTCCCTCGCCTAGTGTAGATCAGTCAGATCAGATTAAA
 AGCAAAAAGAATCTATTTGGAAATTATACTCCCCCTGTCAATAAAGAGGTTTCATCGATGGTATGAAGCAG
 GATGGGTAGAACCTACTTGGTTCTGGGAAAATTCTCCTAAGGATCCCAATGATAGAGATTT**ACTGCACT**
AGTCCCCCATACAGAATTGTTTCGCTTAGTGCAGCCTCAAGACATCTTATTCTCAAAAAGGCCAGGATT
 CAAGAACATGAGATGATTCTACATCTGCCTGTGTTACTTACCCTTATGCCATATTATTAGGATTACCTC
 AGTTAATAGATATAGAGAAAAGAGGATCTACTTTTCATATTTCTGTCTTCTTGTAGATTGACTAATTG
 TTTAGACTCTTCT**GCCTACGACTATGCAGCGAT**CATAGTCAAGAGGCCGC**CATATGTGCTGCTACCTGTA**
 GATATTGGTGATGAACCATGGTTTGATGATTCTGCCATTCAAACCTTTAGGTATGCCACAGATTTAATTC
 GAGCTAAGCGATTTCGTCGCAGCCATTATCCTGGGCATATCTGCTTTGATTGCTATTATTACTTCCCTTGC
 TGTAGCTACTACTGCCTTAGTTAAGGAGATGCAAACCTGCTACGTTTGTAAATAATCTTCATAGGAATGTT
 ACATTAGCCTTATCTGAACAACGGATAATAGATTTAAAATTAGAAGCTAGACTTAATGCTTTAGAAGAAG
 TAGTTTTAGAGTTGGGACAAGATGTGGCCAATTTAAAGACCAGAATGTCCACTAGGTGTTCATGCCAAATTA

Fonte: próprio autor.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando Tampão 1x (20mM de Tris-HCl pH 8,5; 50mM de KCl), 75 µM de dNTP, 0,1µM de cada iniciador, 1,5mM de MgCl₂ e 1,25U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA).

A reação de amplificação ocorreu em termociclador 2720 (Applied Biosystems[®], Foster City, Califórnia, EUA), nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; e uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. O DNA genômico obtido de tecido mamário de camundongo fêmea foi utilizado como

controle positivo e um controle negativo sem adição de DNA foi empregado em todas as reações de PCR, para certificar a ausência de contaminação.

Os produtos do *nested*-PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) corado com nitrato de prata (AgNO_3). Após a segunda reação de PCR, na análise das amostras em gel de poliacrilamida, foi observado um fragmento de 251pb, o qual indica a presença do DNA do gene *env* do HMTV.

3.4 Sequenciamento

Os produtos de *nested*-PCR para HMTV foram purificados utilizando PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 50ng de *template* e 5pM de *primers* da segunda reação de *Nested*-PCR em um volume final de 10 μ L. As condições de PCR foram as seguintes: 10 segundos a 95°C, 30 ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a 50°C e 1 minuto a 60°C. Os fragmentos amplificados foram sequenciados em Genetic Analyzer 3500XL 24 capilares (Applied Biosystems).

3.5 Análise Estatística

A análise de correlação entre a presença de DNA do HMTV e os parâmetros prognósticos foi realizada através do coeficiente de correlação Tau-b de Kendall (SPSS 20.0 Inc., Chicago, Illinois, USA). Para todos os dados, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS LIKE DNA SEQUENCE IN HUMAN BREAST CANCER SUBTYPES: POSSIBLE CORRELATION WITH CLINICAL PARAMETERS

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is a complex heterogeneous disease whose evolution depends on the tumor-host interaction. It is generally accepted that environmental factors play a role in the etiology of various types of cancer. The mouse mammary tumor virus (MMTV) has been suggested as a candidate for viral etiology of BC. The identification of the similar sequence to MMTV, called human mammary tumor virus (HMTV), has supported the theory of viral involvement in the BC pathogenesis. However, several key issues remain unclear, such as the clinical significance of its infection and its role in the BC pathogenesis. Therefore, this study aimed to detect the presence of MMTV like DNA (MMTV-L) in 216 human mammary tumor tissue and correlate with clinicopathological parameters. The sequence of 251bp referring to the MMTV-L *env* gene was evaluated by nested PCR and the sequencing was performed to confirm the amplification of the studied gene. MMTV-L sequence was verified in 19.0% (n=41) of BC tissue. Among these patients MMTV-L were also present in 53.1% (n=17) of peripheral blood samples. In our study, there was no significant correlation between the viral DNA with clinicopathological parameters in general BC nor in Luminal A and triple negative subtypes. However, there was a significant correlation for TNM staging in Luminal B subtype ($\tau = -0.382$, $p = 0.042$). The same result was observed for HER2-enriched subtype ($\tau = -0.551$, $p = 0.001$), in which was also verified correlation with lymph node commitment ($\tau = -0.559$, $p = 0.015$). Regarding peripheral blood samples, there were a trend for age ($\tau = -0.355$, $p = 0.053$) and lymph nodes commitment ($\tau = -0.400$, $p = 0.051$). Based on these results, we can infer a possible correlation between the presence of MMTV-L and breast cancer subtypes and clinical parameters in Brazilian BC patients. However, other studies are necessary to clarify the mechanisms by which this virus can induce carcinogenesis and progression in BC.

Keywords: HMTV; mammary tumor; DNA; clinicopathologic parameters.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is a serious public health problem, considering the number of women who are diagnosed and deaths that occur annually from this disease.

The clinical course and survival of BC vary for each patient and depend on a complex series of factors. Some of the risk factors are age over 40 years (Siegel, Miller et al. 2017), family history (Brewer, Jones et al. 2017), early menarche, late menopause, late age in first pregnancy and nulliparity (Horn, Åsvold et al. 2013). Hormone replacement therapy involves exogenous estrogen administration, which has been identified as a risk factor for breast cancer (Ban and Godellas 2014). Lifestyle, such as excessive alcohol use and high-fat diet, have been identified as important risk factors in recent years (Makarem, Chandran et al. 2013, Jung, Wang et al. 2016).

It is generally accepted that environmental factors play a role in the etiology of various types of cancer. Some viruses, due to their complexity, are considered etiological agents of some neoplasia, such as cervical cancer (Human Papilloma Virus), lymphoma (Epstein-Barr Virus) and leukemias (Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I). Further, other viruses have been reported to induce carcinogenesis, such as the Human Mammary Tumor Virus (HMTV) (Etkind, Du et al. 2000). Retroviruses are good candidates to participate in the etiology of some diseases that, like BC, appear sporadically or hereditarily (Labat 1998).

Mouse mammary tumor virus (MMTV), from *Betaretroviridae* family, was first related as carcinogenic agent by Bittner (1936) and this virus is the most common etiologic agent of BC and T-cell lymphomas in mice (Mason 2000, Lawson 2006, Lawson 2006).

Since the discovery of MMTV, several researchers have sought viral participation in human mammary carcinogenesis. Some studies have indicated that a virus similar to MMTV, called MMTV-like (MMTV-L) or Human Mammary Tumor Virus (HMTV), may be a risk factor for human BC (Melana, Nepomnaschy et al. 2010, Deligdisch, Marin et al. 2013). The possible role of HMTV DNA sequences in human BC remains controversial. The *env* gene sequence is represented by an open reading frame (ORF) of approximately 1.6 kb, being 94-99% identical to the *env* gene of MMTV and, when present in BC samples, can indicate the presence of the virus (Mok 2008). This sequence was found in varying proportions in breast tumor tissues, ranging from 0 to 74% of cases, but rarely in normal tissues (Hachana 2008).

The hypothesis that a retrovirus homologous to the MMTV virus is involved in the etiology of human BC has fascinated scientists for many years but has never been convincingly demonstrated. Despite a large number of molecular epidemiological studies, the association of HMTV DNA with the risk of human BC remains inconclusive mainly due to the heterogeneity in populations involved (Wang, Hou et al. 2014, Al Dossary, Alkharsah et al. 2018, Amarante, de Sousa Pereira et al. 2019).

The association has already been reported in a study by Narthey, Mazzanti et al. (2017), in which the DNA sequence corresponding to the HMTV *env* gene was identified in 9 breast tumor tissue samples, 5 of which were considered positive for the presence of the virus in benign lesions collected 1 to 11 years before the diagnosis of BC, reinforcing the association between HMTV and human BC. The parallel between human and murine tumoral breast tissue has been another point of intense debate in the literature (Finke et al., 2002, Mant and Cason, 2005, Mason et al., 2011). In previous study, correlation between human and mouse histology and the identification of HMTV were not statistically significant (Lawson, Tran et al. 2006). These results were probably due to the inconsistent identification of MMTV by PCR. Recently, Lawson, Mazzanti et al. (2018) demonstrated the presence of HMTV in tumor tissue throughout PCR and immunohistochemistry using antibody for p14, which added validity to the hypothesis.

In this context, the aim of the present study was to investigate the presence of MMTV like DNA (MMTV-L) in BC patients and correlate to clinicopathologic parameters.

MATERIALS AND METHODS

Human Subjects

Following approval from Human Ethics Committee of Londrina State University (CAAE 47709015200005231), women with diagnosis of BC were invited to participate during the clinical care in the specialized services and in Londrina Cancer Hospital. The form of free-informed consent was signed by all donors prior the collection. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria (Brierley, Gospodarowicz et al. 2017). Immunohistochemical analysis were performed as a clinical routine in the Laboratory of Clinical Pathology of the Londrina Cancer Hospital, following standard protocol

(Hammond, Hayes et al. 2010, Wolff, Hammond et al. 2013). To accomplish this work, 216 samples of tumor mammary tissue were analyzed. Among positive samples for MMTV-L, 32 samples of peripheral blood from the same BC patient were collected for MMTV-L investigation. It was not possible to obtain some clinicopathological data from medical records of all the patients included in this study.

DNA extraction

Genomic DNA was obtained from tissue and blood samples by salting-out method (Kirby 1990). DNA samples were quantified by NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA) at a wavelength of 260/280nm and adjusted for a concentration of 200ng/ μ L.

Nested PCR for HMTV DNA

Sequence referred to *env* gene from HMTV/MMTV-L was determinate by nested polymerase chain reaction (PCR), using four oligonucleotides described by Nartey, Moran et al. (2014), according to the sequence deposited in GenBank (Accession Number KJ831810). DNA amplification reactions was performed using 1x Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl), 75 μ M dNTP, 0.1 μ M of each primer, 1.5 mM MgCl₂ and 1.25 U Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The reaction took place on thermocycle Biocycler (Biosystems, Brazil), on the following conditions: 95°C for 5 minutes; followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds; and a final extension of 72°C for 7 minutes. Genomic DNA obtained from female mouse mammary tissue was used as a positive control and a negative control without DNA addition was employed in all PCR reactions. The amplified products were visualized in 10% polyacrylamide gel stained with silver nitrate. The amplification of 251pb product were considered as positive result for MMTV-L.

Sequencing

Nested-PCR products for MMTV-L were purified using PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. Sequencing reaction were performed using the BigDye® Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), 50ng of template and 5 pM primer in a final volume of 10 μ L. PCR conditions will be as follows: 10 seconds at 95°C, 30 cycles of 20

seconds at 95°C, 20 seconds at 50°C and 1 minute at 60°C. The amplified fragments were sequenced on Genetic Analyzer 3500XL 24 capillaries (Applied Biosystems).

Statistical analysis

Correlation analyses involving the detection of HMTV DNA in relation to prognostic parameters were performed by Kendall's Tau b test (SPSS 20.0 Inc., Chicago, Illinois, USA). For all data, the significance level adopted was $p < 0.05$.

RESULTS

Total of 216 BC samples was included in this work. It was verified that 91.0% of patients presented invasive ductal carcinoma, 4.3% presented *in situ* carcinoma, 3.0% presented invasive lobular carcinoma and 1.7% presented other type of BC. The median age was 53 years and the median tumor size was 2.35cm.

The electrophoretic profile for second PCR to MMTV-L *env* gene is demonstrated in Figure 1.

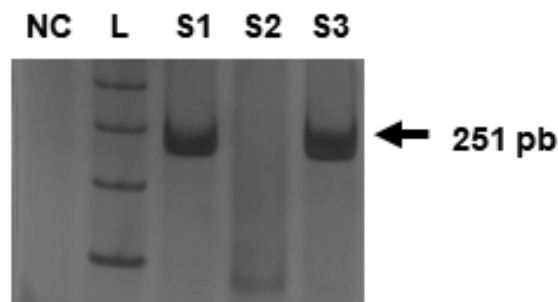


Figure 1. Electrophoretic profile for HMTV DNA. The detection of HMTV *env* gene was analyzed on polyacrylamide gel (10%), stained with silver nitrate. NC: negative control; L: 100pb ladder (Invitrogen, USA); S1: positive sample (251bp); S2: negative sample; S3: positive control.

All positive samples were sequenced and compared to sequences deposited in GenBank (KJ831810). The resulting sequences revealed identity with the *env* DNA region of the HMTV/MMTV-L, demonstrating the specificity of the primers.

In tumor tissue, HMTV *env* gene was presented in 19.0% (41/216) of samples. BC samples were grouped based on estrogen and progesterone receptor status (ER/PR) and HER2 overexpression, into 4 subgroups corresponding Luminal A, Luminal B, HER2-enriched and triple negative. Clinicopathological parameters for

patients within each subgroup and detection of MMTV-L sequence are shown in Table 1. There was no correlation between presence of MMTV-L and prognostic parameters in general BC group.

Table 1. Clinicopathological features distribution among BC subtypes and MMTV-L in tumor tissue.

Clinicopathological parameters	Total n (%)	MMTV-L		
		Positive n (%)	Negative n (%)	
Age (n= 215)	<40	23 (10.7)	5 (12.5)	18 (10.3)
	40-49	59 (27.5)	11 (27.5)	48 (27.4)
	50-59	50 (23.2)	8 (20.0)	42 (24.0)
	60-69	49 (22.8)	7 (17.5)	42 (24.0)
	70-79	25 (11.6)	7 (17.5)	18 (10.3)
	>80	9 (4.2)	2 (5.0)	7 (4.0)
		$\tau = 0.011$	$p = 0.865$	
Tumor Size (cm) (n= 213)	< 1.5	57 (26.8)	7 (17.1)	50 (29.1)
	1.5-3	100 (46.9)	23 (56.1)	77 (44.8)
	>3	56 (26.3)	11 (26.8)	45 (26.1)
		$\tau = 0.065$	$p = 0.282$	
TNM Staging (n= 168)	0	10 (5.9)	2 (6.5)	8 (5.9)
	I	36 (21.4)	8 (25.8)	28 (20.4)
	II	69 (41.1)	11 (35.4)	58 (42.3)
	III	44 (26.2)	8 (25.8)	36 (26.3)
	IV	9 (5.4)	2 (6.5)	7 (5.1)
		$\tau = -0.019$	$p = 0.799$	
Histological grade (n= 203)	I	28 (13.8)	5 (12.8)	23 (14.0)
	II	85 (41.9)	14 (35.9)	71 (43.3)
	III	90 (44.3)	20 (51.3)	70 (42.7)
		$\tau = 0,058$	$p = 0.395$	
Lymph nodes commitment (n= 207)	Positive	97 (46.9)	19 (47.5)	78 (46.7)
	Negative	110 (53.1)	21 (52.5)	89 (53.3)
	$\tau = 0,008$	$p = 0.903$		
Progesterone receptor status (n= 206)	Positive	112 (54.4)	22 (55.0)	90 (54.2)
	Negative	94 (45.6)	18 (45.0)	76 (45.8)
	$\tau = 0.006$	$p = 0.928$		
Estrogen receptor status (n= 206)	Positive	165 (80.1)	33 (82.5)	132 (79.5)
	Negative	41 (19.9)	7 (17.5)	34 (20.5)
	$\tau = 0,030$	$p = 0.660$		
HER2 overexpression (n= 201)	Positive	37 (18.4)	11 (28.2)	26 (16.0)
	Negative	164 (81.6)	28 (71.8)	136 (84.0)
		$\tau = 0.124$	$p = 0.123$	
Ki67 status (n= 184)	Low (<14%)	48 (26,1)	9 (25.0)	39 (26.3)
	Moderate (14-50%)	79 (42.9)	16 (44.4)	63 (42.6)
	High (>50%)	57 (31.0)	11 (30.6)	46 (31.1)
	$\tau = 0.004$	$p = 0.956$		

p53 status (n= 194)	Mutated	67 (34.5)	15 (42.8)	52 (32.7)
	Wild	127 (65.5)	20 (57.2)	107 (67.3)

$\tau = 0.082$ $p = 0.272$

Kendall's Tau-b correlation coefficient. * $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

Among the positive samples, molecular subtypes of BC were distributed as shown in Figure 2. It was verified that the majority of samples positive for MMTV-L belonged to the Luminal A subtype, most common molecular subtype of BC. There was no association with molecular subtypes and MMTV-L ($t = -0.026$, $p = 0.685$).

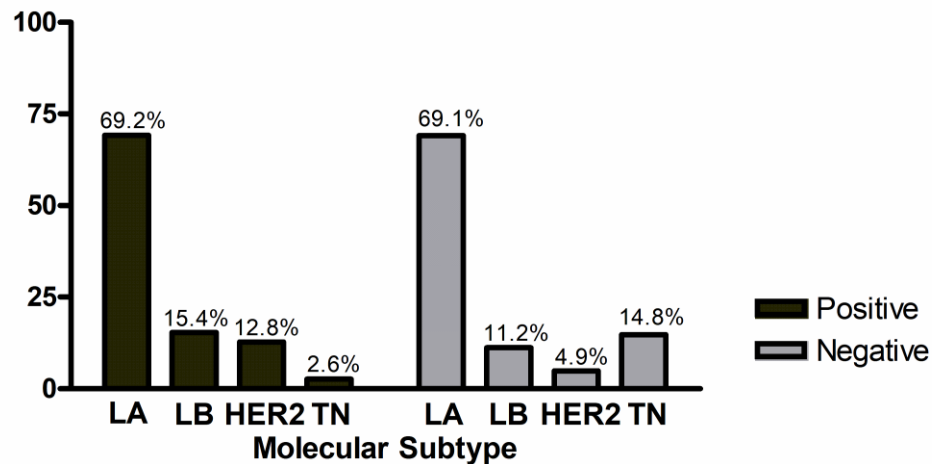


Figure 2. Molecular subtypes of BC MMTV-L positive and negative. HMTV DNA samples were stratified according hormonal receptors and HER2 overexpression. LA: Luminal A, LB: Luminal B, HER2: HER2-enriched and TN: Triple-negative.

In the next step, the correlation between prognostic parameters for MMTV-L and BC subtypes were evaluated. There was no correlation for Luminal A subtype, only a trend for tumor size and p53 status (Table 2).

Table 2. Correlation analyze between clinicopathological parameters and MMTV-L in Luminal A tumor tissue.

Clinicopathological parameters	Total n (%)	MMTV-L		
		Positive n (%)	Negative n (%)	
Age (n= 138)	<40	11 (8.0)	2 (7.7)	9 (8.0)
	40-49	37 (26.8)	8 (30.8)	29 (25.9)
	50-59	32 (23.2)	5 (19.2)	27 (24.1)
	60-69	33 (23.9)	4 (15.4)	29 (25.9)
	70-79	19 (13.8)	6 (23.1)	13 (11.6)
	>80	6 (4.3)	1 (3.8)	5 (4.5)
		$\tau = 0.012$	$p = 0.878$	
Tumor Size (cm) (n= 138)	< 1.5	40 (29.0)	5 (18.5)	35 (31.5)
	1.5-3	69 (50.0)	13 (48.1)	56 (50.5)
	>3	29 (21.0)	9 (33.4)	20 (18.0)
		$\tau = 0.151$	$p = 0.066$	
TNM Staging (n= 106)	0	5 (4.7)	0 (0.0)	5 (5.8)
	I	29 (27.4)	5 (25.0)	24 (27.9)
	II	40 (37.7)	6 (30.0)	34 (39.6)
	III	25 (23.6)	7 (35.0)	18 (20.9)
	IV	7 (6.6)	2 (10.0)	5 (5.8)
		$\tau = 0.130$	$p = 0.149$	
Histological grade (n= 130)	I	24 (18.5)	5 (19.2)	19 (18.3)
	II	63 (48.5)	11 (42.3)	52 (50.0)
	III	43 (33.0)	10 (38.5)	33 (31.7)
		$\tau = 0.035$	$p = 0.688$	
Lymph nodes commitment (n= 137)	Positive	62 (45.3)	14 (51.8)	48 (43.6)
	Negative	75 (54.7)	13 (48.2)	62 (56.4)
		$\tau = 0.066$	$p = 0.446$	
Ki67 status (n= 125)	Low (<14%)	43 (34.4)	8 (32.0)	35 (35.0)
	Moderate (14-50%)	60 (48.0)	12 (48.0)	48 (48.0)
	High (>50%)	22 (17.6)	5 (20.0)	17 (17.0)
		$\tau = 0.032$	$p = 0.710$	
p53 status (n= 132)	Mutated	31 (23.5)	10 (40.0)	21 (19.6)
	Wild	101 (76.5)	15 (60.0)	86 (80.4)
		$\tau = 0.188$	$p = 0.061$	

Kendall's Tau-b correlation coefficient. * $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

In Table 3, analyzing Luminal B subtype, a negative correlation was verified for MMTV-L and TNM staging ($\tau = -0.382$, $p = 0.042$).

Table 3. Correlation analyze between clinicopathological parameters and HMTV DNA in Luminal B tumor tissue.

Clinicopathological parameters		Total n (%)	MMTV-L Positive n (%)	Negative n (%)
Age (n= 24)	<40	2 (8.3)	2 (33.3)	0 (0.0)
	40-49	10 (41.6)	2 (33.3)	8 (44.4)
	50-59	4 (16.7)	0 (0.0)	4 (22.2)
	60-69	7 (29.2)	2 (33.3)	5 (27.8)
	70-79	1 (4.2)	0 (0.0)	1 (5.6)
		$\tau = -0.230$	$p = 0.289$	
Tumor Size (cm) (n= 24)	< 1.5	5 (20.8)	2 (33.3)	3 (16.7)
	1.5-3	14 (58.4)	4 (66.7)	10 (55.6)
	>3	5 (20.8)	0 (0.0)	5 (27.7)
		$\tau = -0.285$	$p = 0.087$	
TNM Staging (n= 19)	I	1 (5.3)	0 (0.0)	1 (6.7)
	II	3 (15.8)	2 (50.0)	1 (6.7)
	III	9 (47.4)	2 (50.0)	7 (46.6)
	IV	6 (31.5)	0 (0.0)	6 (40.0)
		$\tau = -0.382$	$p = 0.042^*$	
Histological grade (n= 24)	I	1 (4.2)	0 (0.0)	1 (5.5)
	II	9 (37.5)	2 (33.3)	7 (38.9)
	III	14 (58.3)	4 (66.7)	10 (55.6)
		$\tau = 0.110$	$p = 0.559$	
Lymph nodes commitment (n= 22)	Positive	12 (54.5)	2 (40.0)	10 (58.8)
	Negative	10 (45.5)	3 (60.0)	7 (41.2)
		$\tau = -0.158$	$p = 0.460$	
Ki67 status (n= 21)	Low (<14%)	3 (14.4)	1 (20.0)	2 (12.6)
	Moderate (14-50%)	9 (42.8)	2 (40.0)	7 (43.7)
	High (>50%)	9 (42.8)	2 (40.0)	7 (43.7)
		$\tau = -0.058$	$p = 0.789$	
p53 status (n= 20)	Mutated	11 (55.0)	2 (50.0)	9 (56.3)
	Wild	9 (45.0)	2 (50.0)	7 (43.7)
		$\tau = -0.050$	$p = 0.823$	

Kendall's Tau-b correlation coefficient. * $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

In HER2-enriched subtype (Table 4), it was verified a negative correlation for TNM staging and for lymph nodes commitment. Nevertheless, no correlation was detected for triple negative samples (Table 5).

Table 4. Correlation between clinicopathological parameters and MMTV-L in HER2-enriched tumor tissue.

Clinicopathological parameters	Total n (%)	MMTV-L		
		Positive n (%)	Negative n (%)	
Age (n= 13)	<40	3 (23.0)	0 (0.0)	3 (37.5)
	40-49	2 (15.4)	1 (20.0)	1 (12.5)
	50-59	5 (38.5)	3 (60.0)	2 (25.0)
	60-69	1 (7.7)	0 (0.0)	1 (12.5)
	70-79	1 (7.7)	0 (0.0)	1 (12.5)
	>80	1 (7.7)	1 (20.0)	0 (0.0)
	$\tau = 0.257$	$p = 0.261$		
Tumor Size (cm) (n= 12)	< 1.5	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (14.3)
	1.5-3	8 (66.7)	4 (80.0)	4 (57.1)
	>3	3 (25.0)	1 (20.0)	2 (28.6)
	$\tau = 0.029$	$p = 0.916$		
TNM Staging (n= 13)	0	2 (15.4)	2 (40.0)	0 (0.0)
	I	2 (15.4)	1 (20.0)	1 (12.5)
	II	6 (46.1)	2 (40.0)	4 (50.0)
	III	2 (15.4)	0 (0.0)	2 (25.0)
	IV	1 (7.7)	0 (0.0)	1 (12.5)
	$\tau = -0.551$	$p = 0.001^*$		
Histological grade (n= 12)	II	4 (33.3)	1 (25.0)	3 (37.5)
	III	8 (66.7)	3 (75.0)	5 (62.5)
	$\tau = 0.125$	$p = 0.652$		
Lymph nodes commitment (n= 11)	Positive	3 (27.3)	0 (0.0)	3 (50.0)
	Negative	8 (72.7)	5 (100.0)	3 (50.0)
	$\tau = -0.559$	$p = 0.015^*$		
Ki67 status (n= 10)	Moderate (14-50%)	4 (40.0)	2 (50.0)	2 (33.3)
	High (>50%)	6 (60.0)	2 (50.0)	4 (66.7)
	$\tau = -0.167$	$p = 0.598$		
p53 status (n= 12)	Mutated	8 (66.7)	2 (50.0)	6 (75.0)
	Wild	4 (33.3)	2 (50.0)	2 (25.0)
	$\tau = -0.250$	$p = 0.401$		

Kendall's Tau-b correlation coefficient. * $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

Table 5. Analysis for correlation between clinicopathological parameters and MMTV-L in Triple-negative tumor tissue.

Clinicopathological parameters	Total n (%)	MMTV-L		
		Positive n (%)	Negative n (%)	
Age (n= 25)	<40	5 (20.0)	1 (100.0)	4 (16.8)
	40-49	5 (20.0)	0 (0.0)	5 (20.8)
	50-59	6 (24.0)	0 (0.0)	6 (25.0)
	60-69	5 (20.0)	0 (0.0)	5 (20.8)
	70-79	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (8.3)
	>80	2 (8.0)	0 (0.0)	2 (8.3)
	$\tau = -0.257$		$p = 0.289$	
Tumor Size (cm) (n= 24)	< 1.5	4 (16.7)	1 (25.0)	3 (15.0)
	1.5-3	4 (16.7)	0 (0.0)	4 (20.0)
	>3	16 (66.6)	3 (75.0)	13 (65.0)
	$\tau = 0.037$		$p = 0.857$	
Staging (n= 24)	I	2 (8.3)	0 (0.0)	2 (8.7)
	II	11 (45.8)	0 (0.0)	11 (47.8)
	III	10 (41.7)	1 (100.0)	9 (39.1)
	IV	1 (4.2)	0 (0.0)	1 (4.4)
	$\tau = 0.189$		$p = 0.300$	
Histological grade (n= 25)	II	6 (24.0)	0 (0.0)	6 (25.0)
	III	19 (76.0)	1 (100.0)	18 (75.0)
	$\tau = 0.115$		$p = 0.319$	
Lymph nodes commitment (n= 25)	Positive	12 (48.0)	1 (100.0)	11 (45.8)
	Negative	13 (52.0)	0 (0.0)	13 (54.2)
	$\tau = 0.212$		$p = 0.296$	
Ki67 status (n= 24)	Low (<14%)	1 (4.2)	0 (0.0)	1 (4.3)
	Moderate (14-50%)	5 (20.8)	0 (0.0)	5 (21.7)
	High (>50%)	18 (75.0)	1 (100.0)	17 (74.0)
	$\tau = 0.118$		$p = 0.317$	
p53 status (n= 25)	Mutated	11 (44.0)	1 (100.0)	10 (41.7)
	Wild	14 (56.0)	0 (0.0)	14 (58.3)
	$\tau = -0.230$		$p = 0.295$	

Kendall's Tau-b correlation coefficient. $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

All positive tumor tissue samples for MMTV-L were tested for viral DNA in blood samples from the same patients where MMTV-L was detected in 53.1% (17/32) of samples. Median age was 48 years and the median value of tumor size was 2.0 cm. Not all tumor samples that were positive for MMTV-L was detected in 53.1% (17/32) were also positive for peripheral blood as demonstrated in Table 6. Although it was not detected a statistically significant correlation, there was a tendency for aging and lymph nodes commitment.

Table 6. Correlation between clinicopathological parameters and MMTV-L in tumor tissue and peripheral blood from BC patients.

Clinicopathological parameters		Total n (%)	MMTV-L Positive Tumor and Blood n (%)	Positive Tumor n (%)
Age (n= 20)	<40	3 (15.0)	2 (20.0)	1 (10.0)
	40-49	7 (35.0)	5 (50.0)	2 (20.0)
	50-59	4 (20.0)	2 (20.0)	2 (20.0)
	60-69	3 (15.0)	0 (0.0)	3 (30.0)
	70-79	3 (15.0)	1 (10.0)	2 (20.0)
		$\tau = -0.355$	$p = 0.053$	
Molecular Subtype (n= 19)	Luminal A	15 (79.0)	9 (90.0)	6 (66.7)
	Luminal B	2 (10,5)	1 (10.0)	1 (11.1)
	HER2	2 (10,5)	0 (0.0)	2 (22.2)
		$\tau = -0.303$	$p = 0.164$	
Tumor Size (cm) (n= 20)	< 1.5	2 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)
	1.5-3	11 (55.0)	5 (50.0)	6 (60.0)
	>3	7 (35.0)	4 (40.0)	3 (30.0)
		$\tau = 0.085$	$p = 0.694$	
TNM Staging (n= 20)	0	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
	I	5 (25.0)	3 (30.0)	2 (20.0)
	II	7 (35.0)	3 (30.0)	4 (40.0)
	III	5 (25.0)	2 (20.0)	3 (30.0)
	IV	2 (10.0)	2 (20.0)	0 (0.0)
		$\tau = 0.132$	$p = 0.515$	
Histological grade (n= 20)	I	3 (15.0)	3 (30.0)	0 (0.0)
	II	8 (40.0)	3 (30.0)	5 (50.0)
	III	9 (45.0)	4 (40.0)	5 (50.0)
		$\tau = -0.225$	$p = 0.280$	
Lymph nodes commitment (n= 20)	Positive	10 (50.0)	3 (30.0)	7 (70.0)
	Negative	10 (50.0)	7 (70.0)	3 (30.0)
		$\tau = -0.400$	$p = 0.051$	
Progesterone receptor status (n= 19)	Positive	11 (57.9)	5 (50.0)	6 (66.7)
	Negative	8 (42.1)	5 (50.0)	3 (33.3)
		$\tau = -0.169$	$p = 0.455$	
Estrogen receptor status (n= 19)	Positive	17 (89.5)	10 (100.0)	7 (77.8)
	Negative	2 (10.5)	0 (0.0)	2 (22.2)
		$\tau = 0.362$	$p = 0.109$	
HER2 overexpression (n = 19)	Positive	4 (21.1)	1 (10.0)	3 (33.3)
	Negative	15 (78.9)	9 (90.0)	6 (66.7)
		$\tau = -0.286$	$p = 0.204$	

Ki67 status (n= 18)	Low (<14%)	3 (16.7)	1 (11.1)	2 (22.2)
	Moderate (14-50%)	10 (55.5)	5 (55.6)	5 (55.6)
	High (>50%)	5 (27.8)	3 (33.3)	2 (22.2)
p53 status (n= 17)		$\tau = 0.160$	$p = 0.468$	
	Mutated	8 (47.1)	5 (62.5)	3 (33.3)
	Wild	9 (52.9)	3 (37.5)	6 (66.7)
		$\tau = 0.292$	$p = 0.210$	

Kendall's Tau-b correlation coefficient. * $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

DISCUSSION

BC samples included in this study were mostly invasive ductal carcinoma (91.0%), which is in agreement with epidemiological data available in the literature (Li, Anderson et al. 2003). Patients were on average 54 years of age, which show concordance to the literature that observed that 89.0% of BC cases are diagnosed from the age of 40 (Youlden, Cramb et al. 2012).

MMTV-L *env* gene was found in varying proportions in BC tissue, ranging from 0.0 to 74.0% of cases (Keydar, Selzer et al. 1982, Wang, Holland et al. 1995, Wang, Pelisson et al. 2001, Faedo, Ford et al. 2004, Pogo, Holland et al. 2010, Ahangar Oskouee, Shahmahmoodi et al. 2014, San, Fujisawa et al. 2017). In the present study, we found MMTV-L in 19.0% of BC tissue analyzed, which is in agreement with the findings in the Chinese (16.8%) (Luo, Wu et al. 2006), Tunisian (13.9%) (Hachana, Trimeche et al. 2008), Mexican (12.4%) (Cedro-Tanda, Cordova-Solis et al. 2014) and Pakistan (20.0%) (Naushad, Bin Rahat et al. 2014) populations. This is the first time that the presence of MMTV-L in 53.1% (17/32) is described in Brazil. Another study has already been carried out in South America, specifically in Argentina, which found the presence of virus DNA in 31% of BC samples (Melana, Picconi et al. 2002). On the other hand, studies carried out in the Japanese (Fukuoka, Moriuchi et al. 2008) and Iranian (Ahangar Oskouee, Shahmahmoodi et al. 2014) populations observed no evidence of the presence of HMTV DNA in tissue samples.

The metadata analysis reported by Wang, Hou et al. (2014) observed a lack of association between HMTV DNA in BC patients and expression of ER, PR, HER2, p53 or histological grades. Same results were found in a recently study from Lawson, Mazzanti et al. (2018). In agreement with these authors, we did not find any

correlation between MMTV-L and clinicopathological parameters in BC tissue. So, we decided to analyze subtypes, and we found that in Luminal B subtype, the presence of MMTV-L was detected in 53.1% (17/32) is correlated with low TNM staging in BC. Same correlation was observed in the HER2-enriched subtype. Also, MMTV-L is associated with absence of lymph nodes commitment in this molecular subtype. This is the first time that a correlation analysis of clinicopathological parameters and MMTV-L DNA in molecular subtypes of BC has been described in the literature.

Mammary tumors in mice induced by MMTV are hormone dependent, due to hormonal responsive elements presented in the LTR gene (McGrath and Jones 1978). In human BC, these elements seem to play an important role in neoplastic cell proliferation, as their role in mouse BC (Wang, Melana et al. 2003). Our findings show that MMTV-L is associated with a better prognosis in Luminal B and HER2-enriched subtypes, which may be explained by the fact that the tumor mammary cells of these subtypes are less responsive to hormones due the lack estrogen and progesterone receptors expression, mainly in HER2-enriched subtypes. In addition, BC shows expression of genes related to inflammation and viral infection, such as interferons (IFN) (Fernandez-Cobo, Melana et al. 2006). The immune response provided by type I IFNs has been shown to be an important suppressive factor in the metastatic process (Slaney, Möller et al. 2013), which may explain the association of viral DNA with the absence of lymph node involvement in HER2-enriched BC. Besides that, MMTV does not encode miRNA but alters host miRNA levels, including increased expression of members of the oncogenic miRNA clusters and downregulated the expression of miR-10b-5p, a “metastamiR”, indicating that MMTV-induced BC in mice are not metastatic (Kincaid, Panicker et al. 2018).

Being a retrovirus, detection of HMTV proviral sequences in the pathological human samples was markedly confounded with human endogenous retroviruses (HERV), which constitutes around 8% of the human genome. However, with the improvement of molecular techniques, such as sequencing, detection of HMTV sequences was achieved using highly specific primer pairs that detect *env* sequences of MMTV with low homology to HERV (Wang, Holland et al. 1995). It is noteworthy that our detection was a nested PCR using primers specific to the *env* region of the MMTV where all the amplicons were sequenced.

Therefore, in the present work we also investigated the presence of MMTV-L in the peripheral blood from all patients who presented HMTV DNA in the tumor

tissue. Interestingly, some patients had MMTV DNA both tumor and peripheral blood. There was a tendency for a negative correlation with age ($p = 0.053$) and lymph node involvement ($p = 0.051$). Although it was not statistically significant, we can speculate that the younger patients correlated with the positivity of MMTV-L in both the tumor and the peripheral blood and the involvement of lymph node stacking correlated with MMTV-L in the peripheral blood and tumor.

We can highlight that a minority of breast tumors may be involved with HMTV DNA. In this way, we can infer that proviral DNA in the human genome of a minority of patients could over time, perhaps by some endogenous factors, such as APOBEC enzymes, trigger the pathogenesis of BC. APOBEC enzymes has been shown in literature as an inducer of carcinogenesis in several types of cancer (Roberts, Lawrence et al. 2013). Previous studies has proposed that the mutational signature in BC is consistent with the activity of the antiviral enzymes APOBEC3A and APOBEC3B (Burns, Lackey et al. 2013). Such enzymes may be induced by immunological response mechanisms, MMTV may be amenable to antiviral ameliorating APOBEC-induced mutagenesis in BC. On the other hand, in younger patients, the presence of DNA in the peripheral blood, besides the tumor, could be an indication of better prognosis, showing absence of lymph nodes involvement in these cases.

The present work collaborates with several other studies that have already detected MMTV like DNA sequence in breast cancer tissue samples, moreover it was demonstrated MMTV-L in stratified BC subtypes. However new studies may now focus on the elucidation of probable carcinogenic and progression mechanisms for this virus in order to better understanding of MMTV-L role on BC. This knowledge can pave the way for the development of new preventive, prognostic and therapeutic approaches in humans.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the volunteers who made this study possible. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Londrina State University Pos-Graduate Coordination (PROPPG-UEL). Nathália de Sousa Pereira was a fellow of the Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brazil.

Informed consent: Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Declaration of Interest Statement

The authors declare no conflicts of interests regarding the publication of this manuscript.

REFERENCES

- Ahangar Oskouee, M., S. Shahmahmoodi, S. Jalilvand, M. Mahmoodi, A.-A. Ziaee, H. A. Esmaeili, T. Mokhtari-Azad, M. Yousefi, Y. Mollaei-Kandelous and R. Nategh (2014). "No Evidence of Mammary Tumor Virus env Gene-Like Sequences among Iranian Women with Breast Cancer." *Intervirolgy* **57**(6): 353-356.
- Ahangar Oskouee, M., S. Shahmahmoodi, S. Jalilvand, M. Mahmoodi, A. A. Ziaee, H. A. Esmaeili, T. Mokhtari-Azad, M. Yousefi, Y. Mollaei-Kandelous and R. Nategh (2014). "No Evidence of Mammary Tumor Virus *env* Gene-Like Sequences among Iranian Women with Breast Cancer." *Intervirolgy* **57**(6): 353-356.
- Al Dossary, R., K. R. Alkharsah and H. Kussaibi (2018). "Prevalence of Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-like sequences in human breast cancer tissues and adjacent normal breast tissues in Saudi Arabia." *BMC Cancer* **18**(1): 170.
- Amarante, M. K., N. de Sousa Pereira, G. A. F. Vitiello and M. A. E. Watanabe (2019). "Involvement of a mouse mammary tumor virus (MMTV) homologue in human breast cancer: Evidence for, against and possible causes of controversies." *Microbial Pathogenesis* **130**: 283-294.
- Ban, K. A. and C. V. Godellas (2014). "Epidemiology of Breast Cancer." *Surgical Oncology Clinics of North America* **23**(3): 409-422.
- Bittner, J. J. (1936). "Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice." *Science* **84**(2172): 162.
- Brewer, H. R., M. E. Jones, M. J. Schoemaker, A. Ashworth and A. J. Swerdlow (2017). "Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure." *Breast Cancer Research and Treatment* **165**(1): 193-200.
- Brierley, J., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours*. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.
- Burns, M. B., L. Lackey, M. A. Carpenter, A. Rathore, A. M. Land, B. Leonard, E. W. Refsland, D. Kotandeniya, N. Tretyakova, J. B. Nikas, D. Yee, N. A. Temiz, D. E. Donohue, R. M. McDougle, W. L. Brown, E. K. Law and R. S. Harris (2013). "APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer." *Nature* **494**(7437): 366-370.
- Cedro-Tanda, A., A. Cordova-Solis, T. Juarez-Cedillo, E. Pina-Jimenez, M. E. Hernandez-Caballero, C. Moctezuma-Meza, G. Castelazo-Rico, A. Gomez-Delgado, A. C. Monsalvo-Reyes, F. A. Salamanca-Gomez, D. J. Arenas-Aranda and N. Garcia-Hernandez (2014). "Prevalence of HMTV in breast carcinomas and unaffected tissue from Mexican women." *BMC Cancer* **14**: 942.
- Deligdisch, L., T. Marin, A. T. Lee, P. Etkind, J. F. Holland, S. Melana and B. G. Pogo (2013). "Human mammary tumor virus (HMTV) in endometrial carcinoma." *Int J Gynecol Cancer* **23**(8): 1423-1428.

- Etkind, P., J. Du, A. Khan, J. Pillitteri and P. H. Wiernik (2000). "Mouse mammary tumor virus-like ENV gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient." Clin Cancer Res **6**(4): 1273-1278.
- Faedo, M., C. E. Ford, R. Mehta, K. Blazek and W. D. Rawlinson (2004). "Mouse mammary tumor-like virus is associated with p53 nuclear accumulation and progesterone receptor positivity but not estrogen positivity in human female breast cancer." Clin Cancer Res **10**(13): 4417-4419.
- Fernandez-Cobo, M., S. M. Melana, J. F. Holland and B. G. Pogo (2006). "Transcription profile of a human breast cancer cell line expressing MMTV-like sequences." Infectious Agents and Cancer **1**(1): 7.
- Fukuoka, H., M. Moriuchi, H. Yano, T. Nagayasu and H. Moriuchi (2008). "No association of mouse mammary tumor virus-related retrovirus with Japanese cases of breast cancer." Journal of Medical Virology **80**(8): 1447-1451.
- Hachana, M., M. Trimeche, S. Ziadi, K. Amara, N. Gaddas, M. Mokni and S. Korbi (2008). "Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia." Cancer Letters **271**(2): 222-230.
- Hachana, M. T., M.; Ziadi, S.; Amara, K.; Gaddas, N.; Mokni, M.; Korbi, S. (2008). "Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia." Cancer Letters **271**(2): 222-230.
- Hammond, M. E., D. F. Hayes, M. Dowsett, D. C. Allred, K. L. Hagerty, S. Badve, P. L. Fitzgibbons, G. Francis, N. S. Goldstein, M. Hayes, D. G. Hicks, S. Lester, R. Love, P. B. Mangu, L. McShane, K. Miller, C. K. Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano, J. N. Schwartz, F. C. Sweep, S. Taube, E. E. Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R. B. Williams, J. L. Wittliff and A. C. Wolff (2010). "American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version)." Archives of Pathology & Laboratory Medicine **134**(7): e48-72.
- Horn, J., B. O. Åsvold, S. Opdahl, S. Tretli and L. J. Vatten (2013). "Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study." Breast Cancer Research and Treatment **139**(1): 237-243.
- Jung, S., M. Wang, K. Anderson, L. Baglietto, L. Bergkvist, L. Bernstein, P. A. van den Brandt, L. Brinton, J. E. Buring, A. H. Eliassen, R. Falk, S. M. Gapstur, G. G. Giles, G. Goodman, J. Hoffman-Bolton, P. L. Horn-Ross, M. Inoue, L. N. Kolonel, V. Krogh, M. Lof, P. Maas, A. B. Miller, M. L. Neuhouser, Y. Park, K. Robien, T. E. Rohan, S. Scarmo, L. J. Schouten, S. Sieri, V. L. Stevens, S. Tsugane, K. Visvanathan, L. R. Wilkens, A. Wolk, E. Weiderpass, W. C. Willett, A. Zeleniuch-Jacquotte, S. M. Zhang, X. Zhang, R. G. Ziegler and S. A. Smith-Warner (2016). "Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies." International journal of epidemiology **45**(3): 916-928.
- Keydar, I., G. Selzer, S. Chaitchik, M. Hareuveni, S. Karby and A. Hizi (1982). "A viral antigen as a marker for the prognosis of human breast cancer." European Journal of Cancer and Clinical Oncology **18**(12): 1321-1328.
- Kincaid, R. P., N. G. Panicker, M. M. Lozano, C. S. Sullivan, J. P. Dudley and F. Mustafa (2018). "MMTV does not encode viral microRNAs but alters the levels of cancer-associated host microRNAs." Virology **513**: 180-187.
- Kirby, L. T. (1990). DNA Fingerprint. Londres, Palgrave Macmillan UK.
- Labat, M. L. (1998). "Possible retroviral etiology of human breast cancer." Biomedicine & Pharmacotherapy **52**(1): 6-12.

- Lawson, J. S., C. Mazzanti, P. Civita, M. Menicagli, C. C. Ngan, N. J. Whitaker, J. Hochman, O. Braitbard, B. Yosufi and W. K. Glenn (2018). "Association of Mouse Mammary Tumor Virus With Human Breast Cancer: Histology, Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction Analyses." Front Oncol **8**: 141.
- Lawson, J. S., D. D. Tran, E. Carpenter, C. E. Ford, W. D. Rawlinson, N. J. Whitaker and W. Delprado (2006). "Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer." J Clin Pathol **59**(12): 1287-1292.
- Lawson, J. S. G., W. H.; Whitaker, N. J. (2006). "Viruses and human breast cancer." Future Microbiology **1**(1): 33-51.
- Lawson, J. S. T., D. D.; Carpenter, E.; Ford, C. E.; Rawlinson, W. D.; Whitaker, N. J.; Delprado, W. (2006). "Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer." Journal of Clinical Pathology **59**(12): 1287-1292.
- Li, C. I., B. O. Anderson, J. R. Daling and R. E. Moe (2003). "Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma." JAMA **289**(11): 1421-1424.
- Luo, T., X. T. Wu, M. M. Zhang and K. Qian (2006). "[Study of mouse mammary tumor virus-like gene sequences expressing in breast tumors of Chinese women]." Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **37**(6): 844-846, 851.
- Makarem, N., U. Chandran, E. V. Bandera and N. Parekh (2013). "Dietary fat in breast cancer survival." Annual review of nutrition **33**: 319-348.
- Mason, A. (2000). "Is there a breast cancer virus?" The Ochsner journal **2**(1): 36-39.
- McGrath, C. M. and R. F. Jones (1978). "Hormonal Induction of Mammary Tumor Viruses and Its Implications for Carcinogenesis." Cancer Research **38**(11 Part 2): 4112-4125.
- Melana, S. M., I. Nepomnaschy, J. Hasa, A. Djougarian, A. Djougarian, J. F. Holland and B. G. Pogo (2010). "Detection of human mammary tumor virus proteins in human breast cancer cells." J Virol Methods **163**(1): 157-161.
- Melana, S. M., M. A. Picconi, C. Rossi, J. Mural, L. V. Alonio, A. Teyssie, J. F. Holland and B. G. Pogo (2002). "[Detection of murine mammary tumor virus (MMTV) env gene-like sequences in breast cancer from Argentine patients]." Medicina (B Aires) **62**(4): 323-327.
- Mok, M. T. S. L., J. S.; Iacopetta, B. J.; Whitaker, N. J. (2008). "Mouse mammary tumor virus-like env sequences in human breast cancer." International Journal of Cancer **122**(12): 2864-2870.
- Nartey, T., C. M. Mazzanti, S. Melana, W. K. Glenn, G. Bevilacqua, J. F. Holland, N. J. Whitaker, J. S. Lawson and B. G. Pogo (2017). "Mouse mammary tumor-like virus (MMTV) is present in human breast tissue before development of virally associated breast cancer." Infect Agent Cancer **12**: 1.
- Nartey, T., H. Moran, T. Marin, K. F. Arcaro, D. L. Anderton, P. Etkind, J. F. Holland, S. M. Melana and B. G. Pogo (2014). "Human Mammary Tumor Virus (HMTV) sequences in human milk." Infectious Agents and Cancer **9**: 20.
- Naushad, W., T. Bin Rahat, M. K. Gomez, M. T. Ashiq, M. Younas and H. Sadia (2014). "Detection and identification of mouse mammary tumor virus-like DNA sequences in blood and breast tissues of breast cancer patients." Tumour Biol **35**(8): 8077-8086.
- Pogo, B. G., J. F. Holland and P. H. Levine (2010). "Human mammary tumor virus in inflammatory breast cancer." Cancer **116**(11 Suppl): 2741-2744.

- Roberts, S. A., M. S. Lawrence, L. J. Klimczak, S. A. Grimm, D. Fargo, P. Stojanov, A. Kiezun, G. V. Kryukov, S. L. Carter, G. Saksena, S. Harris, R. R. Shah, M. A. Resnick, G. Getz and D. A. Gordenin (2013). "An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers." Nat Genet **45**(9): 970-976.
- San, T. H., M. Fujisawa, S. Fushimi, T. Yoshimura, T. Ohara, L. Soe, N. W. Min, O. Kyaw, X. Yang and A. Matsukawa (2017). "Low prevalence of human mammary tumor virus (HMTV) in breast cancer patients from Myanmar." Infect Agent Cancer **12**: 20.
- Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2017). "Cancer statistics, 2017." CA: A Cancer Journal for Clinicians **67**(1): 7-30.
- Slaney, C. Y., A. Möller, P. J. Hertzog and B. S. Parker (2013). "The role of Type I interferons in immunoregulation of breast cancer metastasis to the bone." Oncoimmunology **2**(1): e22339-e22339.
- Wang, F., J. Hou, Q. Shen, Y. Yue, F. Xie, X. Wang and H. Jin (2014). "Mouse mammary tumor virus-like virus infection and the risk of human breast cancer: a meta-analysis." Am J Transl Res **6**(3): 248-266.
- Wang, Y., J. F. Holland, I. J. Bleiweiss, S. Melana, X. Liu, I. Pelisson, A. Cantarella, K. Stellrecht, S. Mani and B. G. Pogo (1995). "Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer." Cancer Res **55**(22): 5173-5179.
- Wang, Y., S. M. Melana, B. Baker, I. Bleiweiss, M. Fernandez-Cobo, J. F. Mandeli, J. F. Holland and B. G. Pogo (2003). "High prevalence of MMTV-like env gene sequences in gestational breast cancer." Med Oncol **20**(3): 233-236.
- Wang, Y., I. Pelisson, S. M. Melana, V. Go, J. F. Holland and B. G. Pogo (2001). "MMTV-like env gene sequences in human breast cancer." Arch Viro **146**(1): 171-180.
- Wolff, A. C., M. E. Hammond, D. G. Hicks, M. Dowsett, L. M. McShane, K. H. Allison, D. C. Allred, J. M. Bartlett, M. Bilous, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, P. B. Mangu, S. Paik, E. A. Perez, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale and D. F. Hayes (2013). "Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update." Journal of Clinical Oncology **31**(31): 3997-4013.
- Youlten, D. R., S. M. Cramb, N. A. M. Dunn, J. M. Muller, C. M. Pyke and P. D. Baade (2012). "The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality." Cancer Epidemiology **36**(3): 237-248.

5. CONCLUSÕES

- O DNA do vírus HMTV foi encontrado em 19,0% (41/216) das amostras de tecido mamário tumoral. Das amostras tumorais positivas
 - 53,1% (17/32) apresentaram positividade para HMTV no sangue periférico.
 - Não houve correlação significativa entre a presença do DNA viral com os parâmetros clinicopatológicos na amostra geral de câncer de mama.
 - Na análise estratificando por subtipos moleculares de câncer mama, não houve correlação significativa entre a presença do DNA do HMTV com os parâmetros clinicopatológicos no subtipo Liminal A e triplo-negativo. Para o subtipo Luminal B, a presença do DNA do HMTV foi correlacionada a menor estadiamento TNM do câncer de mama. E no subtipo HER2-superexpresso, a presença do DNA do HMTV foi associada a menor estadiamento TNM e a ausência de acometimento de linfonodos.
 - Em relação às amostras de sangue periférico, foi observada uma tendência de correlação entre a presença do DNA viral e pacientes com menor idade ao diagnóstico e com a ausência de comprometimento de linfonodos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De um modo geral, os resultados obtidos neste trabalho demonstram a presença do DNA do HMTV nas amostras de pacientes com tumores mamários, sugerindo a sua possível participação na patogênese do câncer de mama. O HMTV pode ser o ativador de fatores endógenos, como por exemplo as enzimas APOBEC, que, através da sua atividade citidina deaminase, são capazes de causar mutações no material genético tanto viral quanto do hospedeiro. Tais mutações já foram descritas em alguns tipos de câncer, dentre eles o câncer de mama. Assim sendo, estudos adicionais devem ser realizados para esclarecer o papel do HMTV nos mecanismos moleculares da carcinogênese mamária.

A associação entre a presença do DNA viral e os parâmetros clínico patológicos também podem atuar como um fator preditor do prognóstico em alguns subtipos específicos do câncer de mama, contribuindo para a estratificação e tratamento das pacientes.

7. REFERÊNCIAS

ACHA-ORBEA, H.; SHAKHOV, A. N.; FINKE, D. Immune response to MMTV infection. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1594-1609, 2007.

AHANGAR OSKOUEE, M. et al. No Evidence of Mammary Tumor Virus env Gene-Like Sequences among Iranian Women with Breast Cancer. **Intervirol**, v. 57, n. 6, p. 353-356, 2014. ISSN 1423-0100 0300-5526.

AL DOSSARY, R.; ALKHARSAH, K. R.; KUSSAIBI, H. Prevalence of Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-like sequences in human breast cancer tissues and adjacent normal breast tissues in Saudi Arabia. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 170, Feb 9 2018. ISSN 1471-2407 (Electronic) 1471-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29426297> >.

BAN, K. A.; GODELLAS, C. V. Epidemiology of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 409-422, 2014/07/01/ 2014. ISSN 1055-3207. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055320714000283> >.

BINDRA, A. et al. Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 6, p. 1806-1809, Jun 2007. ISSN 0022-1317 (Print) 0022-1317 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485542> >.

BITTNER, J. J. Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice. **Science**, v. 84, n. 2172, p. 162, Aug 14 1936.

BOLANDER, F. F.; BLACKSTONE, M. E. Developmental and hormonal regulation of a mouse mammary tumour virus glycoprotein in normal mouse mammary epithelium. **J Mol Endocrinol**, v. 4, n. 2, p. 101-106, Apr 1990. ISSN 0952-5041 (Print) 0952-5041 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160825> >.

BREWER, H. R. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Res Treat**, v. 165, n. 1, p. 193-200, August 01 2017. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4325-2> >.

BRIERLEY, J.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 8^a edition. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2017.

BURNS, M. B.; TEMIZ, N. A.; HARRIS, R. S. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. **Nat Genet**, v. 45, n. 9, p. 977-983, 2013. ISSN 1061-4036 1546-1718.

CEDRO-TANDA, A. et al. Prevalence of HMTV in breast carcinomas and unaffected tissue from Mexican women. **BMC Cancer**, v. 14, p. 942, 2014. ISSN 1471-2407 (Electronic)
1471-2407 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25495285> >.

CHEANG, M. C. U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 05/20
08/08/received
02/27/revised
03/11/accepted 2009. ISSN 0027-8874
1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684553/>
>.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **FEMINA**, v. 39, n. 10, 2011.

CZARNESKI, J. R., J. C.; ROSS, S. R. Mouse Mammary Tumor Virus and the Immune System. **Immunologic Research**, v. 23, p. 469-479, 2003.

DELIGDISCH, L. et al. Human mammary tumor virus (HMTV) in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Cancer**, v. 23, n. 8, p. 1423-1428, Oct 2013. ISSN 1525-1438 (Electronic)
1048-891X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873177> >.

DONNELLY, R. P.; KOTENKO, S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. **J Interferon Cytokine Res**, v. 30, n. 8, p. 555-564, Aug 2010. ISSN 1557-7465 (Electronic)
1079-9907 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712453> >.

ETKIND, P. et al. Mouse mammary tumor virus-like ENV gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 4, p. 1273-1278, Apr 2000. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10778951> >.

ETKIND, P. R. et al. Clonal isolation of different strains of mouse mammary tumor virus-like DNA sequences from both the breast tumors and non-Hodgkin's lymphomas of individual patients diagnosed with both malignancies. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 17, p. 5656-5664, Sep 1 2004. ISSN 1078-0432 (Print)
1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355890> >.

ETKIND, P. R.; STEWART, A. F. R.; WIERNIK, P. H. Mouse mammary tumor virus (MMTV)-like DNA sequences in the breast tumors of father, mother and daughter. **Infectious Agents and Cancer**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2008.

FAEDO, M. et al. Mouse mammary tumor-like virus is associated with p53 nuclear accumulation and progesterone receptor positivity but not estrogen positivity in human female breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 13, p. 4417-4419, Jul 1 2004. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240531> >.

FINKE, D.; LUTHER, S. A.; ACHA-ORBEA, H. The role of neutralizing antibodies for mouse mammary tumor virus transmission and mammary cancer development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 199-204, 2002. ISSN 0027-8424
 1091-6490.

FORD, C. E.; FAEDO, M.; RAWLINSON, W. D. Mouse mammary tumor virus-like RNA transcripts and DNA are found in affected cells of human breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 21, p. 7284-7289, Nov 1 2004. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15534103> >.

FORD, C. E. et al. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 3, p. 1118-1120, Mar 2003. ISSN 1078-0432 (Print)

1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12631616> >.

FRANCKEN, A. B. et al. Breast cancer in women at high risk: The role of rapid genetic testing for BRCA1 and -2 mutations and the consequences for treatment strategies. **The Breast**, v. 22, n. 5, p. 561-568, 2013/10/01/ 2013. ISSN 0960-9776.

Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960977613002105> >.

FRANK, O. et al. Variable transcriptional activity of endogenous retroviruses in human breast cancer. **J Virol**, v. 82, n. 4, p. 1808-1818, Feb 2008. ISSN 1098-5514 (Electronic)

0022-538X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077721> >.

FUKUOKA, H. et al. No association of mouse mammary tumor virus-related retrovirus with Japanese cases of breast cancer. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 8, p. 1447-1451, 2008. Disponível em: <

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.21247> >.

FUTRAN, J. et al. Transferrin receptor synthesis is an early event in B cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 3, p. 787-792, 1989. Disponível em: <

<http://www.jimmunol.org/content/jimmunol/143/3/787.full.pdf> >.

HACHANA, M. et al. Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia. **Cancer Letters**, v. 271, n. 2, p. 222-230, 2008.

HAMMOND, M. E. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 7, p. e48-72, Jul 2010.

HANAHAHAN, D. **The Hallmarks of Cancer Cell**. 2000.

HERMAN, A. et al. Superantigens: Mechanism of T-Cell Stimulation and Role in Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 9, n. 1, p. 745-772, 1991. Disponível em: < <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.iy.09.040191.003525> >.

HOHN, O.; HANKE, K.; BANNERT, N. HERV-K(HML-2), the Best Preserved Family of HERVs: Endogenization, Expression, and Implications in Health and Disease. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013. ISSN 2234-943X.

HORN, J. et al. Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 139, n. 1, p. 237-243, May 01 2013. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2531-0> >.

HORTOBAGYI, G. N. et al. The Global Breast Cancer Burden: Variations in Epidemiology and Survival. **Clinical Breast Cancer**, v. 6, n. 5, p. 391-401, 2005. ISSN 1526-8209. Disponível em: < <https://doi.org/10.3816/CBC.2005.n.043> >. Acesso em: 2018/12/11.

HSU, W. L. et al. Mouse Mammary Tumor Virus-Like Nucleotide Sequences in Canine and Feline Mammary Tumors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4354-4362, 2010. Disponível em: < <https://jcm.asm.org/content/jcm/48/12/4354.full.pdf> >.

INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro 2017.

JOHAL, H. et al. Mouse mammary tumor like virus sequences in breast milk from healthy lactating women. **Breast Cancer Res Treat**, v. 129, n. 1, p. 149-155, Aug 2011. ISSN 1573-7217 (Electronic) 0167-6806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21365265> >.

JONKERS, J.; BERNIS, A. Retroviral insertional mutagenesis as a strategy to identify cancer genes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1287, n. 1, p. 29-57, 1996/05/16/ 1996. ISSN 0304-419X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304419X9500020G> >.

JUNG, S. et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. **International journal of epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 916-928, 2016. ISSN 1464-3685 0300-5771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26320033> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5005939/> >.

KASSIOTIS, G. Endogenous Retroviruses and the Development of Cancer. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1343-1349, 2014. ISSN 0022-1767 1550-6606.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Research**, 2012.

KEYDAR, I. et al. A viral antigen as a marker for the prognosis of human breast cancer. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 18, n. 12, p. 1321-1328, Dec 1982. ISSN 0277-5379 (Print) 0277-5379 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6299750> >.

KIRBY, L. T. **DNA Fingerprint**. Londres: Palgrave Macmillan UK, 1990.

LABAT, M. L. Possible retroviral etiology of human breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 52, n. 1, p. 6-12, 1998.

LAWSON, J. S.; GUNZBURG, W. H.; WHITAKER, N. J. Viruses and human breast cancer. **Future Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 33-51, Jun 2006.

LAWSON, J. S. et al. Association of Mouse Mammary Tumor Virus With Human Breast Cancer: Histology, Immunohistochemistry and Polymerase Chain Reaction Analyses. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. 141, 2018-May-07 2018. ISSN 2234-943X. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00141> >.

LAWSON, J. S. et al. Mouse mammary tumour virus (MMTV) and human breast cancer with neuroendocrine differentiation. **Infectious Agents and Cancer**, v. 12, n. 1, 2017. ISSN 1750-9378.

LAWSON, J. S. et al. Presence of mouse mammary tumour-like virus gene sequences may be associated with morphology of specific human breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 12, p. 1287-1292, Dec 2006.

LAWSON, J. S. et al. Elevated expression of the tumor suppressing protein p53 is associated with the presence of mouse mammary tumor-like env gene sequences (MMTV-like) in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 87, n. 1, p. 13-17, Sep 2004. ISSN 0167-6806 (Print) 0167-6806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377846> >.

LEVINE, P. H. et al. Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic differences. **Cancer**, v. 101, n. 4, p. 721-726, Aug 15 2004. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15305401> >.

LI, Z. et al. Expression of HERV-K Correlates With Status of MEK–ERK and p16INK4A–CDK4 Pathways in Melanoma Cells. **Cancer Investigation**, v. 28, n. 10, p. 1031-1037, 2010/11/01 2010. ISSN 0735-7907. Disponível em: < <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.512604> >.

LIU, B. et al. Identification of a proviral structure in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 4, p. 1754-1759, Feb 15 2001. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245493> >.

LUO, T. et al. [Study of mouse mammary tumor virus-like gene sequences expressing in breast tumors of Chinese women]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 37, n. 6, p. 844-846, 851, Nov 2006. ISSN 1672-173X (Print) 1672-173X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17236577> >.

LYNCH, H. T.; SCHUELKE, G. S.; O'HARA, M. K. Is cancer communicable? **Medical Hypotheses**, v. 14, n. 2, p. 181-198, 1984.

MACMILLAN, A. L.; KOHLI, R. M.; ROSS, S. R. APOBEC3 inhibition of mouse mammary tumor virus infection: the role of cytidine deamination versus inhibition of reverse transcription. **J Virol**, v. 87, n. 9, p. 4808-4817, May 2013. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449789> >.

MAKAREM, N. et al. Dietary fat in breast cancer survival. **Annual review of nutrition**, v. 33, p. 319-348, 2013. ISSN 1545-4312 0199-9885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701588> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3853119/> >.

MANT, C.; CASON, J. Mouse mammary tumor virus and human breast cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 3, p. 1112; author reply 1112-1113, Feb 01 2005. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705914> >.

MANT, C. et al. Human murine mammary tumour virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cancer cell lines or biopsies. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 393-404, Jan 5 2004. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14972564> >.

MASON, A. Is there a breast cancer virus? **The Ochsner journal**, v. 2, n. 1, p. 36-39, 2000. ISSN 1524-5012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765660> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3117553/> >.

MASON, A. L.; GILADY, S. Y.; MACKEY, J. R. Mouse Mammary Tumor Virus in Human Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 179, n. 4, p. 1588-1590, 2011. ISSN 00029440.

MAZZANTI, C. M. et al. A mouse mammary tumor virus env-like exogenous sequence is strictly related to progression of human sporadic breast carcinoma. **Am J Pathol**, v. 179, n. 4, p. 2083-2090, Oct 2011. ISSN 1525-2191 (Electronic) 0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21854742> >.

MAZZANTI, C. M. et al. Human saliva as route of inter-human infection for mouse mammary tumor virus. **Oncotarget**, v. 6, n. 21, p. 18355-18363, Jul 30 2015. ISSN 1949-2553 (Electronic) 1949-2553 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26214095> >.

MCGRATH, C. M.; JONES, R. F. Hormonal Induction of Mammary Tumor Viruses and Its Implications for Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 38, n. 11 Part 2, p. 4112-4125, 1978. Disponível em: <
http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/38/11_Part_2/4112.full.pdf >.

MELANA, S. M.; HOLLAND, J. F.; POGO, B. G. Search for mouse mammary tumor virus-like env sequences in cancer and normal breast from the same individuals. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 2, p. 283-284, Feb 2001. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234880> >.

MELANA, S. M. et al. Detection of human mammary tumor virus proteins in human breast cancer cells. **J Virol Methods**, v. 163, n. 1, p. 157-161, Jan 2010. ISSN 1879-0984 (Electronic) 0166-0934 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781575> >.

MELANA, S. M. et al. Characterization of viral particles isolated from primary cultures of human breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 67, n. 18, p. 8960-8965, Sep 15 2007. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17875739> >.

MELANA, S. M. et al. [Detection of murine mammary tumor virus (MMTV) env gene-like sequences in breast cancer from Argentine patients]. **Medicina (B Aires)**, v. 62, n. 4, p. 323-327, 2002. ISSN 0025-7680 (Print) 0025-7680 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12325488> >.

MOK, M. T. S. et al. Mouse mammary tumor virus-like env sequences in human breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 12, p. 2864-2870, 2008.

MORALES-SANCHEZ, A. et al. No association between Epstein-Barr Virus and Mouse Mammary Tumor Virus with breast cancer in Mexican women. **Sci Rep**, v. 3, p. 2970, Oct 17 2013. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131889> >.

MÜLLER, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, v. 410, p. 50, 03/01/online 2001. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/35065016> >.

NARTEY, T. et al. Mouse mammary tumor-like virus (MMTV) is present in human breast tissue before development of virally associated breast cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 12, n. 1, 2017. ISSN 1750-9378.

NARTEY, T. et al. Human Mammary Tumor Virus (HMTV) sequences in human milk. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, p. 20, 2014.

NAUSHAD, W. et al. Detection and identification of mouse mammary tumor virus-like DNA sequences in blood and breast tissues of breast cancer patients. **Tumour Biol**, v. 35, n. 8, p. 8077-8086, Aug 2014. ISSN 1423-0380 (Electronic) 1010-4283 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24839004> >.

NAUSHAD, W.; SURRIYA, O.; SADIA, H. Prevalence of EBV, HPV and MMTV in Pakistani breast cancer patients: A possible etiological role of viruses in breast cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 230-237, 2017/10/01/ 2017. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134817302393> >.

NUSSE, R. The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion. **Trends in Genetics**, v. 2, p. 244-247, 1986.

OKEOMA, C. M. et al. APOBEC3 proteins expressed in mammary epithelial cells are packaged into retroviruses and can restrict transmission of milk-borne virions. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 6, p. 534-543, Dec 16 2010. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21147467> >.

OKEOMA, C. M. et al. Induction of APOBEC3 in vivo causes increased restriction of retrovirus infection. **J Virol**, v. 83, n. 8, p. 3486-3495, Apr 2009. ISSN 1098-5514 (Electronic) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153238> >.

ONO, M. et al. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. **J Virol**, v. 60, n. 2, p. 589-598, Nov 1986. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3021993> >.

PARK, D. J. et al. No evidence of MMTV-like env sequences in specimens from the Australian Breast Cancer Family Study. **Breast Cancer Res Treat**, v. 125, n. 1, p. 229-235, January 01 2011. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0946-4> >.

PERERA, F. P. Environment and Cancer: Who Are Susceptible? **Science**, v. 278, n. 5340, p. 1068-1073, 1997.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, Aug 17 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> >.

POGO, B. G.; HOLLAND, J. F.; LEVINE, P. H. Human mammary tumor virus in inflammatory breast cancer. **Cancer**, v. 116, n. 11 Suppl, p. 2741-2744, Jun 1 2010. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503403> >.

POGO, B. G. et al. Sequences homologous to the mouse mammary tumor virus env gene in human breast carcinoma correlate with overexpression of laminin receptor. **Clin Cancer Res**, v. 5, n. 8, p. 2108-2111, Aug 1999. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10473094> >.

PROVENZANO, E.; ULANER, G. A.; CHIN, S.-F. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 325-338, 2018. ISSN 1556-8598. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004> >. Acesso em: 2019/01/11.

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 12, n. 4, p. 207-207, 07/30 2010. ISSN 1465-5411 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949637/> >.

REDIG, A. J.; MCALLISTER, S. S. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. **Journal of Internal Medicine**, 2013.

ROBERTS, S. A. et al. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. **Nature Genetics**, v. 45, n. 9, p. 970-976, 2013. ISSN 1061-4036 1546-1718.

ROSS, S. R. MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 13, n. 3, p. 299-307, 2008. ISSN 1573-7039 1083-3021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18661104> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2715138/> >.

ROSS, S. R. Mouse Mammary Tumor Virus Molecular Biology and Oncogenesis. **Viruses**, v. 2, p. 2000-2012, 2010.

ROSS, S. R. et al. Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 19, p. 12386-12390, 2002. ISSN 0027-8424 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12218182> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC129454/> >.

SAN, T. H. et al. Low prevalence of human mammary tumor virus (HMTV) in breast cancer patients from Myanmar. **Infect Agent Cancer**, v. 12, p. 20, 2017. ISSN 1750-9378 (Print) 1750-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28413435> >.

SCHULMAN, H. M. et al. Transferrin receptor and ferritin levels during murine mammary gland development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1010, n. 1, p. 1-6, 1989/01/17/ 1989. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167488989901766> >.

SHARIATPANAHI, S. et al. High prevalence of mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast cancer samples of Iranian women. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 36, n. 10, p. 621-630, Oct 3 2017. ISSN 1532-2335 (Electronic) 1525-7770 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29185860> >.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21387> >.

SLAOUI, M. et al. Detection of MMTV-Like sequences in Moroccan breast cancer cases. **Infect Agent Cancer**, v. 9, p. 37, 2014. ISSN 1750-9378 (Electronic) 1750-9378 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926863> >.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/pnas/98/19/10869.full.pdf> >.

STAVROU, S.; ROSS, S. R. APOBEC3 Proteins in Viral Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 10, p. 4565-4570, 2015. ISSN 0022-1767 1550-6606.

STEWART, B.; WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. International Agency for Research on Cancer, WHO, 2014.

STEWART, T. H. M. et al. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, *Mus domesticus*. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 2, p. 446-451, 2000.

SZABO, S.; HAISLIP, A. M.; GARRY, R. F. Of mice, cats, and men: is human breast cancer a zoonosis? **Microscopy Research and Technique**, v. 68, n. 3-4, p. 197-208, Nov 2005.

SZENTIVANYI, A.; FRIEDMAN, H. **Viruses, Immunity, and Immunodeficiency**. Springer US, 2012. ISBN 9781461321859. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=80fTBwAAQBAJ> >.

TABRIZ, H. M. et al. Lack of Detection of the Mouse Mammary Tumor-like Virus (MMTV) Env Gene in Iranian Women Breast Cancer using Real Time PCR. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 5, p. 2945-2948, 2013. ISSN 1513-7368.

TERAMOTO, Y. A.; CARDIFF, R. D.; LUND, J. K. The structure of the mouse mammary tumor virus: isolation and characterization of the core. **Virology**, v. 77, n. 1, p. 135-148, Mar 1977. ISSN 0042-6822 (Print) 0042-6822 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/65834> >.

TOMANA, M. et al. Antibodies to mouse mammary tumor virus-related antigen in sera of patients with breast carcinoma. **Cancer**, v. 47, n. 11, p. 2696-2703, Jun 1 1981. ISSN 0008-543X (Print) 0008-543X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6266639> >.

VAN DE RIJN, M. et al. Expression of Cytokeratins 17 and 5 Identifies a Group of Breast Carcinomas with Poor Clinical Outcome. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 6, p. 1991-1996, 2002. ISSN 0002-9440. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64476-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64476-8) >. Acesso em: 2018/08/30.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J. M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 659-672, 2007.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1-14, July 01 2014. ISSN 1432-2307. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7> >.

WANG-JOHANNING, F. et al. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 120, n. 1, p. 81-90, 2007. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.22256> >.

WANG, Y. et al. Expression of mouse mammary tumor virus-like env gene sequences in human breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 4, n. 10, p. 2565-2568, Oct 1998. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9796992> >.

WANG, Y. et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 55, n. 22, p. 5173-5179, Nov 15 1995. ISSN 0008-5472 (Print)
0008-5472 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7585568> >.

WANG, Y. et al. A Mouse Mammary Tumor Virus-Like Long Terminal Repeat Superantigen in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, v. 64, p. 4105-4111, 2004.

WANG, Y. et al. High prevalence of MMTV-like env gene sequences in gestational breast cancer. **Med Oncol**, v. 20, n. 3, p. 233-236, 2003. ISSN 1357-0560 (Print)
1357-0560 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14514972> >.

WANG, Y. et al. **Detection of MMTV-like LTR and LTR-env gene sequences in human breast cancer.** 2001a. 1041-1044.

WANG, Y. et al. MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. **Arch Virol**, v. 146, n. 1, p. 171-180, January 01 2001b. ISSN 1432-8798. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s007050170201> >.

WANG, Y. et al. MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. **Arch Virol**, v. 146, n. 1, p. 171-180, 2001c. ISSN 0304-8608 (Print)
0304-8608 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11266212> >.

WARD, S.; PILGRIM, H.; HIND, D. Trastuzumab for the treatment of primary breast cancer in HER2-positive women: a single technology appraisal. **Health Technol Assess**, v. 13 Suppl 1, 2009/07/07 2009. Disponível em: < <http://journalslibrary.nihr.ac.uk/hta/hta13Suppl1-01> >.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? **Molecular Oncology**, v. 4, n. 3, p. 192-208, 2010. Disponível em: < <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/j.molonc.2010.04.004> >.

WITT, A. et al. The mouse mammary tumor virus-like env gene sequence is not detectable in breast cancer tissue of Austrian patients. **Oncol Rep**, v. 10, n. 4, p. 1025-1029, Jul-Aug 2003. ISSN 1021-335X (Print)
1021-335X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792764> >.

WOLFF, A. C. et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 31, p. 3997-4013, Nov 1 2013.

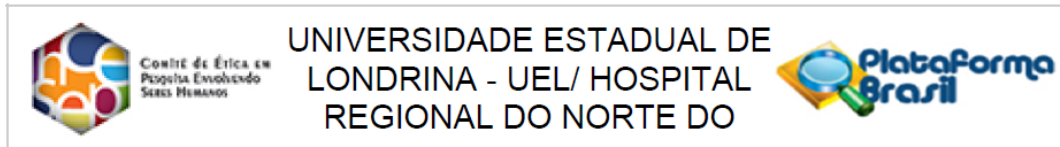
YANAGAWA, S. et al. Mouse mammary tumor virus with rearranged long terminal repeats causes murine lymphomas. **Journal of Virology**, v. 67, n. 1, p. 112-118, 1993. Disponível em: < <https://jvi.asm.org/content/jvi/67/1/112.full.pdf> >.

ZAMMARCHI, F. et al. MMTV-like sequences in human breast cancer: A fluorescent PCR/laser microdissection approach. **Journal of Pathology**, v. 209, n. 4, p. 436-444, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PREVALÊNCIA DO VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO (HMTV) E IMPLICAÇÕES NA PATOGENESE DO CANCER DE MAMA

Pesquisador: MARLA KARINE AMARANTE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 47709015.2.0000.5231

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental

Patrocinador Principal: CNPQ
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.197.692

Apresentação do Projeto:

Projeto intitulado "Prevalência do vírus do tumor mamário (HMTV) e implicações na patogênese do câncer de mama", proposto por Marla Karine Amarante, junto ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, a ser realizado com recursos financeiros próprios e, principalmente, do CNPq. São previstas análises de tecidos mamários tumorais retirados por solicitação médica no Hospital do câncer, bem como amostra de sangue de região periférica.

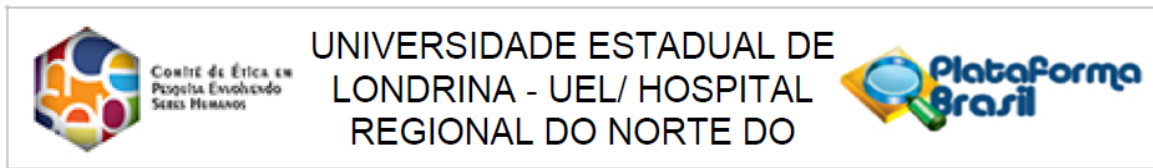
Objetivo da Pesquisa:

Investigar a presença do HMTV em amostras de sangue e tecido tumoral de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, através da técnica de PCR; avaliar a expressão gênica por PCR tempo-real das citocinas TGF-beta, IL-10 e IFN-alfa, -beta e -gamma e utilizar imunoensaio enzimático (ELISA) para a determinação destas mesmas citocinas em amostras de plasma com o objetivo de caracterizar a resposta imune induzida pela infecção. Os resultados podem suscitar evidências de potencial efeito clínico da infecção pelo vírus HMTV em pacientes com câncer de mama e caracterizar possível associação do vírus à patogênese do câncer mamário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Prevê que não haverá riscos às participantes da pesquisa, exceto por algum desconforto

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3
Bairro: Campus Universitário
UF: PR **Município:** LONDRINA **CEP:** 86.057-970
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.197.692

decorrente do procedimento de retirada de 4 ml de sangue. Os benefícios são previstos em forma de produção de conhecimento científico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto adequada.

Termo de concordância com a realização da pesquisa emitido por gestor do Hospital do Câncer de Londrina adequado.

TCLE ajustado, conforme gênero, para participantes diagnosticadas com tumor mamário.

TCLE para participantes saudáveis, em linguagem didática, com previsão de possível desconforto à retirada de amostra de 4 ml de sangue, informação detalhadas sobre quem fará tal procedimento, onde e quando.

Cronograma genérico sem informação sobre datas, mas apenas número estimado de meses.

Custos previstos em grade orçamentária.

Sigilo e confidencialidade garantidos por meio dos TCLE.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	folha de rosto- HMTV.pdf	14/07/2015 13:23:26		Aceito
Outros	Declaração HCL.pdf	15/07/2015 16:14:13		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_553857.pdf	20/07/2015 15:56:58		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_553857.pdf	28/07/2015 14:29:45		Aceito

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3

Bairro: Campus Universitário

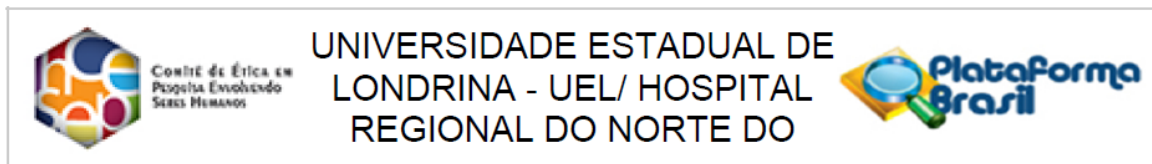
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 1.197.692

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_553857.pdf	29/07/2015 12:16:30		Aceito
Outros	Edital 2014.pdf	29/07/2015 17:24:45		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_553857.pdf	29/07/2015 17:25:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto HMTV- Amarante corrigido.pdf	17/08/2015 15:55:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - 17082015.pdf	17/08/2015 15:55:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 17082015 saudaveis.pdf	17/08/2015 15:56:13		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_553857.pdf	17/08/2015 15:56:45		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 24 de Agosto de 2015

Assinado por:
Paula Mariza Zedu Alliprandini
(Coordenador)

Endereço: PROPPG - LABESC - Sala 3
Bairro: Campus Universitário **CEP:** 86.057-970
UF: PR **Município:** LONDRINA
Telefone: (43)3371-5455 **E-mail:** cep268@uel.br

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**“Prevalência do vírus do tumor mamário (HMTV) e implicações na patogênese do câncer de mama”**

Prezada Senhora:

Gostaríamos de convidá-la para participar da pesquisa “Prevalência do vírus do tumor mamário (HMTV) e implicações na patogênese do câncer de mama”, a ser realizada no Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos na Universidade Estadual de Londrina”. O objetivo da pesquisa é verificar se há presença de moléculas relacionadas ao vírus no tecido, bem como analisar no sangue, determinados tipos de moléculas que podem influenciar no curso da doença da paciente”. Sua participação é muito importante e os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 4mL de sangue para análise das células e moléculas, bem como do tecido mamário tumoral que será retirado e encaminhado para análise histológica e o restante será utilizado para a realização deste projeto.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo a senhora recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Este material coletado será suficiente para a realização desta pesquisa, portanto não restará material coletado. Esclarecemos ainda, que a senhora não pagará e nem será remunerada por sua participação.

Em relação aos benefícios, espera-se no final do projeto, identificarmos se há presença do vírus na amostra analisada e compreender um pouco mais desta doença. O presente estudo não resultará em nenhum dano a participante. O presente estudo não resultará em nenhum dano físico, a exceção de algum desconforto relativo a coleta de sangue que, para ser minimizado, será realizada por profissional experiente no próprio hospital onde será realizada a cirurgia.

Caso a senhora tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá contatar Dra. Marla Karine Amarante, Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, 445, CEP: 86051-970, Tel/Fax: (43) 3371-5629, celular 99903100, email: marla_karine@yahoo.com.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue à senhora.

Londrina, ___ de _____ de 20__.

Pesquisador Responsável:

Marla Karine Amarante

RG 2077143

Ass. _____ (nome _____),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____