



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

NATHÁLIA DE SOUSA PEREIRA

**ESTRESSE CRÔNICO, VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO HUMANO  
(MMTV-like) E POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA ANTIVIRAL:  
POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA**

NATHÁLIA DE SOUSA PEREIRA

**ESTRESSE CRÔNICO, VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO HUMANO  
(MMTV-like) E POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA ANTIVIRAL:  
POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe  
Coorientadora: Profa. Dra. Marla Karine Amarante

Londrina  
2022

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

Pereira, Nathália.

Estresse crônico, vírus do tumor mamário humano (MMTV-like) e polimorfismos de genes envolvidos na resposta antiviral : possíveis fatores associados ao câncer de mama. / Nathália Pereira. - Londrina, 2022.  
144 f. : il.

Orientador: Maria Angelica Ehara Watanabe.

Coorientador: Marla Karine Amarante.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Neoplasia mamária - Tese. 2. Prognóstico - Tese. 3. Polimorfismos genéticos - Tese. 4. Fatores de risco - Tese. I. Ehara Watanabe, Maria Angelica. II. Amarante, Marla Karine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 577.27

NATHÁLIA DE SOUSA PEREIRA

**ESTRESSE CRÔNICO, VÍRUS DO TUMOR MAMÁRIO HUMANO  
(MMTV-like) E POLIMORFISMOS DE GENES ENVOLVIDOS NA  
RESPOSTA ANTIVIRAL:  
POSSÍVEIS FATORES ASSOCIADOS AO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Mario Augusto Ono  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. José Maurício Sforcin  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

---

Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello  
A. C. Camargo Cancer Center

Londrina, 18 de fevereiro de 2022.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em primeiro lugar, por concluir mais uma etapa da minha vida. Desde a graduação até o doutorado, é visível e quase palpável todo o Seu cuidado, proteção e amor. Agradeço eternamente por guiar meus passos para o melhor caminho, mesmo quando eu não compreendia o porquê. Sei que muitos dirão que tudo foi sorte ou coincidência, mas sei que há um Deus, com sua divina providência, a me guardar!

À minha orientadora, **Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe**, por ter me dado um voto de confiança e a oportunidade incrível de fazer parte deste grupo de pesquisa. Não existem palavras para descrever o tamanho da minha gratidão por todos os ensinamentos, por todo o incentivo e por ser um grande exemplo! Dizem que, na vida, nós não esquecemos os nossos “primeiros” e nem os nossos “últimos”, espero que você jamais se esqueça da sua última aluna, título que carregarei com muita honra por toda a minha vida!

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Marla Karine Amarante**, por ser uma peça fundamental em todo meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por ter me presenteado com a oportunidade de trabalhar nesse projeto incrível! Sei que tivemos momentos difíceis ao longo do caminho, mas olhar para trás e ver o quanto evoluímos é extremamente gratificante. Obrigada pelo carinho, pela amizade e pelos conselhos. Conte comigo sempre que precisar!

Aos membros da banca examinadora, **Prof. Dr. Mario Augusto Ono, Prof. Dr. José Mauricio Sforcin, Profa. Dra. Bruna Karina Banin Hirata e Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello**, pela disponibilidade de contribuir com seus conhecimentos na avaliação do presente trabalho.

Às agências de fomento, **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária**, e, em especial, o **Programa de Extensão “Universidade sem Fronteiras” e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior**, pelo auxílio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ser realizado.

A todos os membros do **Laboratório de Polimorfismos de DNA e**

**Imunologia**, pelo companheirismo, pela ajuda e pela troca de conhecimentos na rotina do laboratório. Foram diversas gerações de alunos com quem eu tive o prazer de conviver e, para não ser injusta com ninguém, não citarei nomes, mas saibam o quanto eu sou grata por todos os momentos vividos, principalmente os mais descontraídos no *Happy Hour* do Maximo Villa!

A minha **família** pelo apoio incondicional, pelas orações constantes e por se fazerem tão presentes mesmo estando tão longe. E em especial, aos meus pais, **Nilcéia de Sousa e Luiz Fernando Gonçalves Pereira**, que nunca mediram os meus sonhos com as suas próprias réguas e me impulsionaram a voar cada vez mais alto. Obrigada por toda dedicação, por todos os sacrifícios e por todo o amor. Se não fosse pelo incentivo de vocês, eu jamais chegaria até aqui. Desejo que um dia eu possa retribuir tudo o que vocês já fizeram por mim, mas por agora só me resta dizer que o trabalho de vocês foi concluído e é hora de se dedicar aos seus próprios sonhos!

Aos meus **amigos** por serem verdadeiros presentes de Deus em minha vida. Aprendi, com o passar dos anos, a reconhecer que os verdadeiros amigos são os que passam ao nosso lado nos momentos mais difíceis e que se alegram com as nossas próprias conquistas. Agradeço por todo cuidado, pelo companheirismo e 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!

E por fim, mas não menos importante, meu agradecimento às **pacientes com câncer de mama**, que generosamente aceitaram participar desse estudo, dividindo a sua história de vida e acreditando na ciência e na esperança de dias melhores no futuro!

**“Quem não pode fazer grande coisa, faça ao menos o que estiver na medida de suas forças; certamente não ficará sem recompensa.” – Santo Antônio.**

## RESUMO

PEREIRA, Nathália de Sousa. **Estresse crônico, vírus do tumor mamário humano (MMTV-like) e polimorfismos de genes envolvidos na resposta antiviral: possíveis fatores associados ao câncer de mama.** 2022. 144 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Câncer de mama (CM) é uma doença heterogênea e complexa cuja evolução depende da interação entre tumor e hospedeiro. Esta neoplasia ocorre quando células mamárias começam a proliferar descontroladamente, e assim podem invadir tecidos adjacentes e promover metástases. O CM é um dos tipos de câncer mais estudados do ponto de vista psicossomático, porém resultados controversos estão presentes na literatura sobre o papel que os estressores da vida pregressa e o estresse geral exercem no câncer ou na influência sobre o curso da doença. Além disso, a identificação de uma sequência similar ao vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV), denominada vírus do tumor mamário humano (MMTV-like), tem suportado a teoria do envolvimento viral na patogênese do CM humano. No entanto, várias questões ainda não estão esclarecidas, como os mecanismos da resposta imune antiviral em pacientes com tumores positivos para a presença do DNA MMTV-like. Dessa forma, esse trabalho objetivou investigar o envolvimento e as implicações do estresse crônico, do MMTV-like e mecanismos da resposta imune antiviral em pacientes diagnosticadas com CM atendidas no Hospital do Câncer de Londrina. Com relação ao estresse crônico, as mudanças emocionais foram avaliadas pela Escala de Estresse de Holmes e Rahe, na qual 55,2% das pacientes apresentavam médio risco e 13,8% alto risco para desenvolver estresse crônico no período anterior ao diagnóstico de CM. Os maiores níveis de estresse foram apresentados por pacientes separadas, divorciadas ou viúvas em comparação as casadas ( $p < 0,01$ ) e solteiras ( $p = 0,0377$ ). O grupo de alto risco apresentou menor proporção de positividade para receptor de estrogênio quando comparado aos grupos de baixo e moderado risco ( $p = 0,001$ ). Além disso, foi realizada uma análise de regressão logística binária e constatamos que a relação entre o receptor de estrogênio e o grupo de alto risco estava independentemente associada ao tipo histológico do CM e acometimento de linfonodos. A relação de experiências de vida estressantes e CM não está bem estabelecida, por isso nosso estudo colabora com a literatura para demonstrar a importância do estresse como fator associado ao desenvolvimento de CM. A produção de IFN- $\gamma$  parece não estar associada à presença do DNA MMTV-like e consequentemente à patogênese do CM. Porém foi verificado que os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  foram significativamente menores em amostras de CM ( $30,85 \pm 57,49$  pg/mL) comparados com o grupo controle ( $115,00 \pm 176,80$  pg/mL) ( $p < 0,0001$ ). No entanto, os níveis plasmáticos mais elevados de IFN- $\gamma$  foram observados em pacientes com grau histopatológico avançado, indicando uma correlação com o pior prognóstico da paciente com CM. Uma fonte interessante de mutações de DNA são as enzimas citidina deaminases, pertencentes à família da enzima de edição de RNA de apolipoproteína B, semelhante ao polipeptídeo catalítico 3 (APOBEC3), que são ativadas em uma resposta celular contra a infecção. Essas enzimas são capazes de gerar mutações pontuais no genoma da célula hospedeira, possibilitando a transformação maligna. Portanto, no presente estudo objetivamos avaliar também a associação dos genótipos do polimorfismo de deleção APOBEC3B (APOBEC3

A3A/B) com a detecção do gene env MMTV-like em pacientes com CM. Foi observada ausência de associação entre a presença do gene env do MMTV-like com os genótipos do polimorfismo A3A/B. O genótipo selvagem (WT/WT) estava presente em 86,1% das amostras de CM e o genótipo heterozigoto (WT/Del) em 13,9% dos pacientes. Considerando as amostras negativas do MMTV-like, o genótipo WT/Del foi negativamente correlacionado com o estadiamento do tumor (Tau-b = -0,151; p = 0,044). Em amostras MMTV-like positivas, o genótipo WT/Del foi negativamente correlacionado com a idade ao diagnóstico (Tau-c = -0,382; p = 0,009) e a positivamente correlacionada com a expressão do receptor de estrogênio (Tau-b = 0,179; p = 0,041). A proteína p53, conhecida como supressora de tumor, é capaz de ativar a expressão de diversos genes associados à resposta imune inata e a transcrição do gene TP53 é induzida pela sinalização dos IFNs do tipo I. Diversos vírus, que já foram associados ao desenvolvimento tumoral, podem inibir, direta ou indiretamente, a atividade da p53. O gene que codifica a proteína p53, TP53, possui um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), o rs1042522 (Arg72Pro), e é conhecido que a presença de Arginina (Arg) induz à apoptose, enquanto a presença de Prolina (Pro) induz bloqueio do ciclo celular e reparo do DNA. Neste contexto, foi observada ausência de associação entre a presença do gene env do MMTV-like com os genótipos do polimorfismo rs1042522 do gene TP53. Foi observado que o genótipo Pro/Pro conferiu proteção ao desenvolvimento do CM (p<0,0289; OR: 0,33; IC: 0,12-0,88). No CM geral, foi observada correlação positiva entre os genótipos Arg/Arg e Arg/Pro e a idade (Tau-c = 0,143; p = 0,025) e o portador do alelo Pro e o grau histopatológico (Tau-b = 0,162; p = 0,016). Ao analisar as amostras negativas para o DNA do MMTV-like, foi possível verificar que portadores do alelo Pro foram negativos para a presença da mutação somática de p53 (Tau-b = -0,166; p = 0,032). Este trabalho mostra que diferentes fatores, sendo eles genéticos, ambientais e sociais, podem influenciar a suscetibilidade e/ou prognóstico da doença, enfatizando o caráter multifatorial do carcinoma mamário.

**Palavras-chave:** neoplasia mamária; prognóstico; polimorfismos genéticos; fatores de risco; citocinas.

## ABSTRACT

PEREIRA, Nathália de Sousa. **Chronic stress, human breast tumor virus (MMTV-like) and gene polymorphisms involved in the antiviral response:** possible factors associated with breast cancer. 2022. 144 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Londrina State University, Londrina, 2022.

Breast cancer (BC) is a heterogeneous and complex disease whose evolution depends on the interaction between tumor and host. This neoplasm occurs when breast cells begin to proliferate uncontrollably, as they can invade adjacent tissues and promote metastases. BC is one of the most studied types of general cancer from a psychosomatic point of view, but controversies are present in the literature about the role that previous life stressors and stress play in cancer or in the influence on the disease course. Furthermore, the identification of a sequence similar to mouse mammary tumor virus (MMTV), termed human mammary tumor virus (MMTV-like), has supported the theory of viral involvement in the human BC pathogenesis. However, several issues are still unclear, such as the mechanisms of antiviral response in patients with positive immunoglobulin for the presence of MMTV-like DNA. Thus, this work should investigate the involvement and objectives of effective stress, of the MMTV-like type and mechanisms of the antiviral response in patients diagnosed with BC treated at the Londrina Cancer Hospital. Regarding chronic stress, emotional changes were assessed using the Holmes and Rahe Stress Scale, in which 55.2% of the patients were at medium-risk and 13.8% at high-risk for developing chronic stress in the period prior to BC diagnosis. The highest levels of stress were presented by separated, divorced or widowed patients compared to married ( $p < 0.01$ ) and single ( $p = 0.0377$ ). The high-risk group had a lower proportion of estrogen receptor positivity when compared to low- and moderate-risk groups ( $p = 0.001$ ). In addition, a binary logistic regression analysis was performed, and we found that the relationship between estrogen receptor and high-risk group was independently associated with BC histological type and lymph node involvement. The relationship between stressful life experiences and BC is not well established, so our study collaborates with the literature to demonstrate the importance of stress as a factor associated with the development of BC. The production of IFN- $\gamma$  do not seems to be associated with the presence of MMTV-like DNA and, consequently, with the BC pathogenesis. However, it was found that IFN- $\gamma$  plasma levels were significantly lower in BC sample ( $30.85 \pm 57.49$  pg/mL) compared to the control group ( $115.00 \pm 176.80$  pg/mL) ( $p < 0.0001$ ). Nevertheless, higher plasma levels of IFN- $\gamma$  were observed in patients with advanced histopathological grade, indicating a correlation with the worse BC prognosis. An interesting source of DNA mutations is the cytidine deaminase enzymes belonging to the catalytic polypeptide 3 (APOBEC3) apolipoprotein B mRNA editing enzyme family, which are activated in a cellular response against infection. These enzymes are capable of generating point mutations in the host cell genome, enabling malignant transformation. Therefore, in the present study we also aimed to evaluate the association of APOBEC3B deletion polymorphism (APOBEC3 A3A/B) genotypes with the MMTV-like env gene detection in patients with BC. There was no association between the presence of the MMTV-like env gene and the genotypes of the A3A/B polymorphism. The wild type (WT/WT) was present in 86.1% of the BC samples and the heterozygote genotype (WT/Del) in 13.9%. Considering the MMTV-like negative

samples, the WT/Del was negatively correlated with tumor staging (Tau-b = -0.151; p = 0.044). In MMTV-like positive samples, the WT/Del was negatively correlated with age at diagnosis (Tau-c = -0.382; p = 0.009) and positively correlated with estrogen receptor expression (Tau-b = 0.179; p = 0.041). The p53 protein, known as a tumor suppressor, can activate the expression of several genes associated with the innate immune response, and the transcription of the TP53 gene is induced by type I IFN signaling. Several viruses, which have already been associated with tumor development, have mechanisms capable of inhibiting, directly or indirectly, p53 activity. The gene encoding the p53 protein, TP53, has a single nucleotide polymorphism (SNP), rs1042522 (Arg72Pro), and it is known that the presence of Arginine (Arg) induces apoptosis, while the presence of Proline (Pro) induces cell cycle blockade and DNA repair. In this context, there was no association between the presence of the MMTV-like env gene and the Arg72Pro. It was observed that the Pro/Pro genotype conferred protection to BC development (p<0.0289; OR: 0.33; CI: 0.12-0.88). In the general BC, a positive correlation was observed between the Arg/Arg and Arg/Pro genotypes and age (Tau-c = 0.143; p = 0.025) and the histopathological grade (Tau-b = 0.162; p = 0.016). When analyzing the samples negative for MMTV-like DNA, it was possible to verify that the carrier of the Pro allele were negative for the presence of the somatic mutation of p53 (Tau-b = -0.166; p = 0.032). This work shows that different factors, being genetic, environmental and social, can influence the disease susceptibility and/or prognosis, emphasizing the multifactorial character of breast carcinoma.

**Key words:** breast neoplasm; prognosis; genetic polymorphisms; risk factors; cytokines.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	– Estrutura do Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV) ..	26
<b>Figura 2</b>	– Diagrama da estrutura do RNA do Vírus de Tumor Mamário de Camundongos (MMTV) .....	27
<b>Figura 3</b>	– Distribuição mundial da detecção do Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV-like) em amostras de câncer de mama .....	34
<b>Figura 4</b>	– Representação do alelo de deleção híbrido APOBEC3A-APOBEC3B .....	40

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	–	Estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase do câncer de mama .....	18
<b>Tabela 2</b>	–	Subtipos moleculares do câncer de mama .....	20
<b>Tabela 3</b>	–	Presença de sequências gênicas do Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV-like) em pacientes com câncer de mama. ....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AID	Deaminase Induzida por Ativação (Activation-Induced Desaminase)
APOBEC	Enzima de edição de mRNA de apolipoproteína B, semelhante ao polipeptídeo catalítico (Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like)
BRCA	Gene do Câncer de Mama (Breast Cancer Gene)
CD	Grupamento de diferenciação (Cluster of Differentiation)
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal in situ
CI	Carcinoma invasivo
CM	Câncer de Mama
CME	Carcinoma de Mama Esporádico
CMH	Carcinoma de Mama Hereditário
DNA	Ácido Desoxirribunucleico (Deoxyribonucleic Acid)
EBV	Vírus Epstein-Barr (Epstein Barr Virus)
env	Envelope
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto (Fibroblast Growth Factor)
gag	Antígeno grupo-específico (Group-specific antigen)
HBV	Vírus da Hepatite B (Hepatitis B Virus)
HCV	Vírus da Hepatite C (Hepatitis C Virus)
HER2	Receptor Do Fator De Crescimento Epidermal Humano tipo 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
HERV	Retrovírus Endógenos Humano (Human Endogenous Retroviruses)
HML	(Human MMTV-like)
HPV	Vírus do Papiloma Humano (Human Papilloma Virus)
HTLV-1	Vírus Linfotrófico de Células T Humana tipo 1 (Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
kb	Kilobase
KSHV	Herpesvírus Associado ao Sarcoma de Kaposi (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus)

LTR	Sequência Repetitiva Terminal Longa (Long Tandem Repeat)
MCP	Proteína Quimioatraente de Monócito (Monocyte Chemoattractant Protein)
MCPyV	Poliomavírus da Células de Merkel (Merkel Cell Polyomavirus)
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (Major Histocompatibility Complex)
MMTV	Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (Mouse Mammary Tumor Virus)
MMTV-like	Vírus do Tumor Mamário Humano (Mouse Mammary Tumor Virus like)
NK	Células Natural Killers
ORF	Fase Aberta de Leitura (Open Reading Frame)
pb	Par de Base (Pair Base)
PCR	Reação em Cadeira da Polimerase
pol	Polimerase
RE	Receptor de Estrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)
RP	Receptor de Progesterona
SAg	Superantígeno
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (Single Nucleotide Polymorphism)
TfR	Receptor da Transferrina (Transferrin Receptor)
TGF	Fator de Crescimento Transformante (Transforming Growth Factor)
TLR	Receptor do tipo Toll (Toll Like Receptor)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Fator)
TNM	Sistema Tumor-Nódulo-Metástase
UICC	União Internacional do Controle ao Câncer
UV	Radiação ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	CÂNCER DE MAMA .....	15
1.2	ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE NO CÂNCER DE MAMA .....	20
1.3	PARTICIPAÇÃO VIRAL NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER .....	22
1.3.1	Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV) .....	25
1.3.2	Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV-Like) .....	28
1.4	ENZIMA DE EDIÇÃO DE MRNA DE APOLIPOPROTEÍNA B, SEMELHANTE A POLIPEPTÍDEO CATALÍTICO 3 (APOBEC3) .....	38
1.5	INTERFERON-GAMA .....	41
1.6	PROTEÍNA SUPRESSORA TUMORAL P53 .....	43
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	47
2.1	OBJETIVO GERAL .....	47
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>3</b>	<b>PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	48
3.1	ARTIGO 1 – “AN ASSOCIATION BETWEEN CHRONIC LIFE STRESSORS PRIOR TO DIAGNOSIS OF BREAST CANCER” .....	49
3.2	ARTIGO 2 – “DELETION OF THE APOBEC3B AND DETECTION OF MMTV- LIKE DNA IN BRAZILIAN BREAST CANCER PATIENTS” .....	58
3.3	ARTIGO 3 – “INTERFERON-GAMMA PLASMA LEVELS AND PRESENCE OF MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS-LIKE ENV GENE: IMPLICATIONS ON THE PATHOGENESIS OF BREAST CANCER” .....	72
3.4	ARTIGO 4 – “TP53 GENE POLYMORPHISM GENOTYPES AND DETECTION OF THE MMTV-LIKE ENV GENE IN BRAZILIAN BREAST CANCER PATIENTS” .....	85
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	103
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	104
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	105

<b>ANEXOS</b> .....	131
ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos .....	131
ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido para as pacientes com câncer de mama .....	139
ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido para as mulheres saudáveis.....	140

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer vem adquirindo relevância crescente, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial, visto que este está entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países. Os principais fatores envolvidos no aumento da incidência e da mortalidade por câncer no mundo são o envelhecimento, o crescimento populacional e mudanças na prevalência dos fatores de risco, principalmente os relacionados ao desenvolvimento socioeconômico (SUNG *et al.*, 2021). Para o ano de 2020, a estimativa mundial foi de 19,3 milhões de novos casos de câncer e 10 milhões de mortes causadas por essa doença (SUNG *et al.*, 2021). Já no Brasil, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para o triênio de 2020-2022, aponta a ocorrência de cerca de 625 mil novos casos de neoplasias malignas ao ano (INCA, 2019).

O câncer é caracterizado pela proliferação desregulada de células malignas que surgem a partir de alterações essenciais na fisiologia celular, as quais contribuem para o crescimento dos tumores. HANAHAN e WEINBERG (2000) descreveram algumas características importantes presentes nas células tumorais, consideradas como marcas registradas, sendo elas: a sustentação da sinalização proliferativa, a evasão dos supressores de crescimento, a resistência à morte celular, o potencial de replicação ilimitado, a indução da angiogênese e a capacidade de invasão celular e metástase. Com o avanço dos estudos, os autores acrescentaram outras características importantes adquiridas pela célula tumoral, como a instabilidade genômica, a inflamação promovida pelo tumor, a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição pelo sistema imune (HANAHAN e WEINBERG, 2011). E mais recentemente, HANAHAN (2022) atribuiu outras características à célula tumoral e ao microambiente, como a plasticidade fenotípica, a reprogramação epigenética, os microbiomas polimórficos e as células senescentes.

A maioria dos tipos de cânceres humanos são decorrentes de mutações somáticas resultantes da interação entre diversos fatores de risco, podendo ser fatores intrínsecos ou não-intrínsecos. Os fatores ditos intrínsecos são aqueles referentes a mutações espontâneas inevitáveis, sendo resultado de erro aleatório na replicação do DNA. Já nos fatores não-intrínsecos estão incluídos os fatores externos modificáveis, como a exposição a algum carcinógeno e uso de

xenobióticos; fatores associados ao estilo de vida, como o tabagismo, o sedentarismo, uso de terapias hormonais e consumo de álcool; e fatores endógenos relacionados às características individuais, como o metabolismo, níveis de hormônios, sistema imunológico e a resposta a danos no DNA (WU *et al.*, 2018). Dessa forma, a etiologia do câncer pode ser considerada multifatorial e genética, e não necessariamente hereditária (PERERA, 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. O ambiente celular no qual coexistem tanto células tumorais quanto células-tronco neoplásicas é denominado de microambiente tumoral, estas células presentes no tumor possuem a capacidade de autorrenovação e de promover a tumorigênese (GRIVENNIKOV, GRETEN e KARIN, 2010). O microambiente tumoral engloba as células imunológicas circundantes, vasos sanguíneos, matriz extracelular, fibroblastos, células inflamatórias derivadas da medula óssea e moléculas de sinalização (SPILL *et al.*, 2016). As interações presentes entre os componentes do microambiente afetam o desenvolvimento e progressão tumoral (BALKWILL, CAPASSO e HAGEMANN, 2012).

## 1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama (CM) é um grave problema de saúde pública, considerando o número de mulheres que são diagnosticadas e de óbitos que acontecem anualmente por esta doença. A estimativa da incidência global deste tipo de câncer foi de 2,3 milhões de novos casos no ano de 2020; sendo considerada a quinta causa de morte decorrente de câncer em todo mundo, contabilizando 685 mil mortes também no ano de 2020. Dentre as mulheres, o CM corresponde a 1 caso em cada 4 casos de câncer e a 1 morte em cada 6 mortes em decorrência do câncer (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio de 2020-2022 é de cerca de 66.280 novos casos. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer é o mais frequente nas mulheres em todas as regiões brasileiras, sendo o risco estimado de 81,06/100mil na Região Sudeste; de 71,16/100mil na Região Sul; de 45,24/100mil na Região Centro-Oeste; de

44,29/100mil na Região Nordeste e de 21,34/100mil na Região Norte do país. No ano de 2017, cerca de 17 mil brasileiras foram a óbito em decorrência do CM (INCA, 2019).

O curso clínico do CM 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 CM, sendo a incidência maior em mulheres acima dos 40 anos de idade (SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2017). Mulheres que apresentam um histórico familiar de CM, com 2 ou mais parentes de primeiro grau afetadas, apresentam 2,5 vezes mais risco de desenvolver a doença (BREWER *et al.*, 2017). A presença de mutações em alguns genes relacionados ao desenvolvimento do CM, como o *BRCA1* e *BRCA2*, podem ser atribuídos à suscetibilidade familiar (FRANCKEN *et al.*, 2013). Os fatores reprodutivos também estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento deste câncer como menarca precoce, menopausa tardia e nuliparidade (HORN *et al.*, 2013). A terapia de reposição hormonal, a qual envolve a administração de estrogênio exógeno, tem sido apontada como um fator de risco para o CM (BAN e GODELLAS, 2014). Nos últimos anos, foi observado que o uso excessivo de álcool e obesidade podem estar associados ao aumento do risco de desenvolvimento do CM (JUNG *et al.*, 2016; MAKAREM *et al.*, 2013).

A metástase se inicia com a invasão do tecido circundante por células do tumor primário, até que essas células alcancem os vasos sanguíneos e/ou linfáticos, disseminando para órgãos distantes (TALMADGE e FIDLER, 2010). A migração das células tumorais compartilha muitas semelhanças com o tráfego de leucócitos, o qual é regulado por citocinas, quimiocinas e seus receptores (MÜLLER *et al.*, 2001) O CM é caracterizado por um padrão metastático específico envolvendo linfonodos regionais, medula óssea, pulmão e fígado, sendo que a maioria das mortes em decorrência do CM são resultado do processo metastático (REDIG e MCALLISTER, 2013).

Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o padrão de crescimento patológico, podendo ser divididos em carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos. O tipo histológico mais comum é o carcinoma invasivo não especial, também conhecido por carcinoma ductal invasivo, que corresponde de 70 a 80% dos casos, seguido pelos carcinomas lobulares invasivos, correspondendo a cerca de 10% dos casos diagnosticados de CM (TSANG e TSE, 2020). Os tipos especiais de CM correspondem a 25% dos cânceres diagnosticados e já foram

descritos pelo menos 17 tipos histológicos especiais diferentes entre si (VAJPEYI, 2005). A classificação histológica é baseada em diversos critérios, incluindo o tipo de célula tumoral, a secreção extracelular, as características arquitetônicas e o perfil imunohistoquímico (TSANG e TSE, 2020).

O estadiamento do CM segue a classificação do sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) que classifica os tumores malignos, segundo a União Internacional de Controle ao Câncer (UICC). Os tumores primários são classificados de acordo com o seu tamanho: T0 para os não detectáveis, Tis para os carcinomas *in situ*, T1 para tumores de até 2cm, T2 acima de 2cm até 5cm, T3 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 ausência de metástases linfonodais, N1 metástases em linfonodos axilares ipsilaterais móveis, N2 metástases em linfonodos axilares ipsilaterais clinicamente fixos ou emaranhados e N3 metástase em linfonodos infraclaviculares ipsilaterais com ou sem acometimento de linfonodos axilares. As metástases à distância são classificadas conforme a ausência (M0) ou presença (M1) de órgãos à distância acometidos. A avaliação desses parâmetros permite a classificação do estadiamento do tumor, variando do estadio 0 ao estadio IV, conforme a Tabela 1 (BRIERLEY, GOSPODAROWICZ e WITTEKIND, 2017).

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

<b>Estadiamento</b>	<b>Tumor Primário (T)</b>	<b>Linfonodos Regionais (N)</b>	<b>Metástases à Distância (M)</b>
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

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

**Fonte:** BRIERLEY, GOSPODAROWICZ e WITTEKIND (2017).

A classificação molecular dos CM 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 *et al.*, 2001). Os marcadores utilizados na rotina clínica são: os receptores de estrógeno (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 CM é então classificado em relação à presença ou ausência desses marcadores, sendo que tais subtipos conferem às pacientes diferenças significativas no prognóstico e na resposta terapêutica (RAKHA *et al.*, 2010; WEIGELT, GEYER e REIS-FILHO, 2010). A partir dos perfis de expressão gênica, foram, inicialmente, identificados quatro subtipos moleculares: Luminal A, Luminal B, HER2 superexpresso e basalóide (CIRQUEIRA *et al.*, 2011; PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001).

O subtipo Luminal A é o mais comum, correspondendo a 50-60% de todos os tipos de CM. 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 este subtipo possuem melhor taxa de sobrevida

quando comparadas a outros subtipos moleculares (CHEANG *et al.*, 2009; PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *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 *et al.*, 2009). Alguns tumores não apresentam a positividade para a superexpressão do HER2, mas apresentam índice de proliferação celular superior a 14%. Devido ao aumento de expressão de genes relacionados à proliferação celular, este tipo é mais agressivo quando comparado ao Luminal A (SØRLIE *et al.*, 2001).

As pacientes com CM que apresentam RE positivos fazem uso de antiestrogênicos, como tamoxifeno e inibidores de aromatase. O uso de antiestrogênicos reduz a recorrência e a mortalidade das mulheres diagnosticadas com CM (CIRQUEIRA *et al.*, 2011).

O subtipo HER2 superexpresso ou HER2 positivo corresponde a 20-30% de todos os CM 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 CM (SØRLIE *et al.*, 2001). Entretanto, a utilização de uma terapia alvo-específica, um anticorpo monoclonal humanizado denominado trastuzumabe, melhora o prognóstico dessas pacientes (WARD, PILGRIM e HIND, 2009).

Os tumores de mama do tipo basaloide ou *basal-like* correspondem a 15% de todos os tipos de CM e são caracterizados pela alta expressão de genes correlacionados à 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, ULANER e CHIN, 2018; SØRLIE *et al.*, 2001; VAN DE RIJN *et al.*, 2002; VUONG *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 *et al.*, 2000; PROVENZANO, ULANER e CHIN, 2018; SØRLIE *et al.*, 2001).

Outro subtipo molecular do CM foi identificado sendo denominado *claudin-low* ou claudina-baixa. Esse 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 *et al.*, 2011). Todos os subtipos moleculares do CM estão demonstrados na Tabela 2.

**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+
Triplo-negativo basaloide ou <i>basal-like</i>	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-
Triplo-negativo claudina-baixa	RE-, RP-, HER2-, Claudina+ e E-caderina-

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

## 1.2 ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE NO CÂNCER DE MAMA

O CM é uma das neoplasias mais estudadas do ponto de vista psicossomático, por ser um dos mais prevalentes na população feminina (ARNABOLDI *et al.*, 2014). O estresse pode ser definido como qualquer estímulo

que perturba o equilíbrio interno do corpo, conhecido como homeostase. Talvez o componente mais bem estudado da resposta ao estresse seja a ativação do eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal (HPA). Os neurônios do núcleo paraventricular liberam dois neuro-hormônios, o fator liberador de corticotropina e arginina vasopressina, que estimulam a pituitária a produzir e secretar o hormônio adenocorticotrófico (ACTH). Por sua vez, o ACTH induz a síntese e liberação de glicocorticoides pelas glândulas adrenais. O principal glicocorticoide em humanos é o cortisol, que possui efeitos amplos, como aumentar os níveis de glicose no sangue, modifica o metabolismo de gordura e proteína, influencia na função cardiovascular e no estado imunológico, induzindo reações inflamatórias (STEPHENS e WAND, 2012).

O estresse pode ser classificado em agudo, quando apresenta em um curto período, ou crônico, quando ocorre por um longo período ou se torna repetitivo. O aumento no risco de desenvolvimento de CM foi associado ao estresse induzido por eventos importantes da vida, enquanto o estresse relacionado ao trabalho ou estresse diário variam consideravelmente (ANTONOVA, ARONSON e MUELLER, 2011).

Dentre os eventos importantes da vida da mulher, o luto foi um dos fatores estudados por diversos grupos de pesquisa. Uma meta-análise realizada por DUIJTS, ZEEGERS e BORNE (2003) demonstrou que a morte do parceiro, de familiares e amigos estão significativamente associados ao risco do desenvolvimento do CM. Outros estudos tentaram avaliar o risco de desenvolver esta neoplasia entre mulheres que tiveram um filho com câncer ou que perderam um filho, porém nenhum deles encontrou uma associação clara entre esses principais fatores de estresse e a incidência de CM (JOHANSEN e OLSEN, 1997; KVIKSTAD e VATTEN, 1996; LI *et al.*, 2002). Entretanto, LEVAV *et al.* (2000) relataram um risco maior de incidência de CM entre mulheres israelenses que tiveram a experiência de perder um filho adulto. Por outro lado, a morte da mãe na infância foi avaliada por JACOBS e BOVASSO (2000) em um estudo envolvendo 1.213 mulheres, que foram acompanhadas por 15 anos, sendo observada uma duplicação no risco de CM. Resultado similar foi observado em pacientes que perderam o pai durante a sua infância (YILDIRIM *et al.*, 2018). Apesar disso, outros estudos não observaram associação entre o estresse causado pelo luto e o risco de desenvolvimento do CM, como descrito nas meta-

análises realizadas por PETTICREW, FRASER e REGAN (1999) e SANTOS *et al.* (2009).

O divórcio e separação conjugal foram fatores importantes também relatados em outros estudos. FALLAH *et al.* (2016) observaram uma associação significativa entre a incidência de CM e “grandes problemas no relacionamento interpessoal com o cônjuge”. Tal associação também foi observada em um estudo prospectivo com 10.808 mulheres mostrou que divórcio e separação estão relacionados ao risco de CM (LILLBERG *et al.*, 2003).

Além desses fatores, outros eventos de vida, como doenças graves, problemas financeiros e no trabalho, entre outros, foram avaliados por diversos estudos. De modo geral, foi observado um aumento de duas vezes no risco de desenvolvimento do CM em mulheres que apresentavam alterações em eventos importantes de sua vida (KRUK e ABOUL-ENEIN, 2004; PETTICREW, FRASER e REGAN, 1999; YILDIRIM *et al.*, 2018).

A relação entre o estresse e a recidiva do CM foi avaliada em estudo realizado por FORSÉN (1991) na Finlândia e demonstrou que as experiências vividas 1 ano antes do diagnóstico foram associadas a um maior risco de recidiva após 8 anos de acompanhamento. O estresse crônico antes do diagnóstico também foi associado a um risco ligeiramente maior de recidiva em um estudo na população belga (DE BRABANDER e GERITS, 1999). Entretanto, BARRACLOUGH *et al.* (1993) relataram, em uma população inglesa acompanhada por 3 anos e meio, um menor risco de recaída em pacientes com CM que vivenciaram qualquer evento ou dificuldade grave em 1 ano antes do diagnóstico. Contudo, em outro estudo inglês, as mulheres foram acompanhadas por 5 anos e nenhuma associação foi demonstrada (GRAHAM *et al.*, 2002).

Apesar de uma série de pesquisas focadas na relação entre estresse e CM, há controvérsias sobre o papel que os estressores da vida pregressa e o estresse geral exercem na determinação do câncer ou na influência sobre o curso da doença. Portanto, é necessário que novos estudos sejam realizados para esclarecer essa possível relação.

### 1.3 PARTICIPAÇÃO VIRAL NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER

As infecções virais podem ser reconhecidas como a causa etiológica

de alguns tipos de câncer, devido à complexidade de estrutura de mecanismo de ação dos vírus (SCHELHAAS, 2017). Já está bem estabelecida a associação de alguns vírus com tumores humanos, como o vírus do papiloma humano (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus Epstein-Barr (EBV), herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), o poliomavírus da células de Merkel (MCPyV) e o vírus linfotrófico de células T humana tipo 1 (HTLV-1) (MOORE e CHANG, 2010). Ainda, tem sido relatada a participação de outros vírus em tumores humanos, como por exemplo, o vírus do tumor mamário humano (MMTV-like) (ETKIND *et al.*, 2000).

De forma geral, as infecções virais contribuem em pelo menos 12% de todos os tipos de tumores humanos. A associação de vírus e tumores está frequentemente presente em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico ou em indivíduos que vivem em condições sanitárias precárias e com acesso limitado aos cuidados de saúde (GAGLIA e MUNGER, 2018). Os vírus podem estar envolvidos com a oncogênese devido ao seu potencial de codificar proteínas virais oncogênicas, causar inflamação crônica e/ou promover instabilidade genômica ou outras alterações nas células hospedeiras (GAGLIA e MUNGER, 2018).

Os oncogenes e oncoproteínas virais podem interferir na proliferação celular, aumentando a taxa de proliferação, e na apoptose, tornando a célula resistente à morte. Eventualmente, essas interferências levam a alterações nos mecanismos de reparo de DNA e a instabilidade genômica. Tais alterações, em conjunto, são consideradas características associadas à malignidade celular, conforme descrito anteriormente. Os mecanismos virais para indução dessas mudanças celulares são semelhantes e geralmente convergem em vias de sinalização comuns e fatores de transcrição (MORALES-SÁNCHEZ e FUENTES-PANANÁ, 2014). Como exemplo, temos a inativação de genes supressores tumorais, como o gene do p53 (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

A persistência da infecção viral geralmente é acompanhada por inflamação crônica local. O material genético de alguns vírus pode ativar diversos tipos celulares envolvidos na imunidade, incluindo as células dendríticas, macrófagos e subpopulações específicas de linfócitos. Tais células são capazes de produzir citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como os interferons e interleucinas (HAYASHI *et al.*, 2006; HOCHREIN *et al.*, 2004; SATO, LINEHAN e

IWASAKI, 2006; TAKEUCHI e AKIRA, 2009).

Uma resposta inflamatória normal é autolimitada; porém em uma resposta inflamatória crônica, decorrente da persistência do agente infeccioso, os leucócitos permanecem no local e sua apoptose é suprimida. Na tentativa de eliminar o agente infeccioso, as células imunes produzem radicais livres de oxigênio e nitrogênio, que são consideradas altamente mutagênicas. Considerando a participação de todos esses elementos, a inflamação crônica pode favorecer o aparecimento de uma célula tumoral. Já o processo de regeneração tecidual parece auxiliar no crescimento, invasão e metástase tumoral (ELINAV *et al.*, 2013).

Outro mecanismo carcinogênico promovido pela infecção viral é a instabilidade genômica, que pode resultar em amplificação e deleção de genes, alterações no número de cromossomos (poliploidia e aneuploidia) ou em fusão dos cromossomos não homólogos (translocação) (MORALES-SÁNCHEZ e FUENTES-PANANÁ, 2014). A instabilidade genômica pode ser decorrente da expressão de oncogenes virais, mudanças no microambiente, aumento da taxa de proliferação celular e produção de espécies reativas de oxigênio e outras espécies reativas (GAGLIA e MUNGER, 2018). Uma fonte interessante de mutações de DNA são as enzimas citidina deaminases pertencentes à família da enzima de edição de mRNA de apolipoproteína B, semelhante à polipeptídeo catalítico 3 (APOBEC3), que são ativadas em uma resposta celular contra a infecção. Essas enzimas convertem citosinas em uracilas, com o objetivo de inativar os genomas virais. Porém, essas enzimas também são capazes de gerar mutações pontuais no genoma da célula hospedeira, sendo possível a transformação maligna de tais células (HENDERSON e FENTON, 2015).

Além dos mecanismos carcinogênicos virais apontados anteriormente, as características replicativas da família dos retrovírus também devem ser levadas em consideração. O ciclo replicativo desses vírus envolve um estágio obrigatório no qual o provírus 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 e BERNS, 1996).

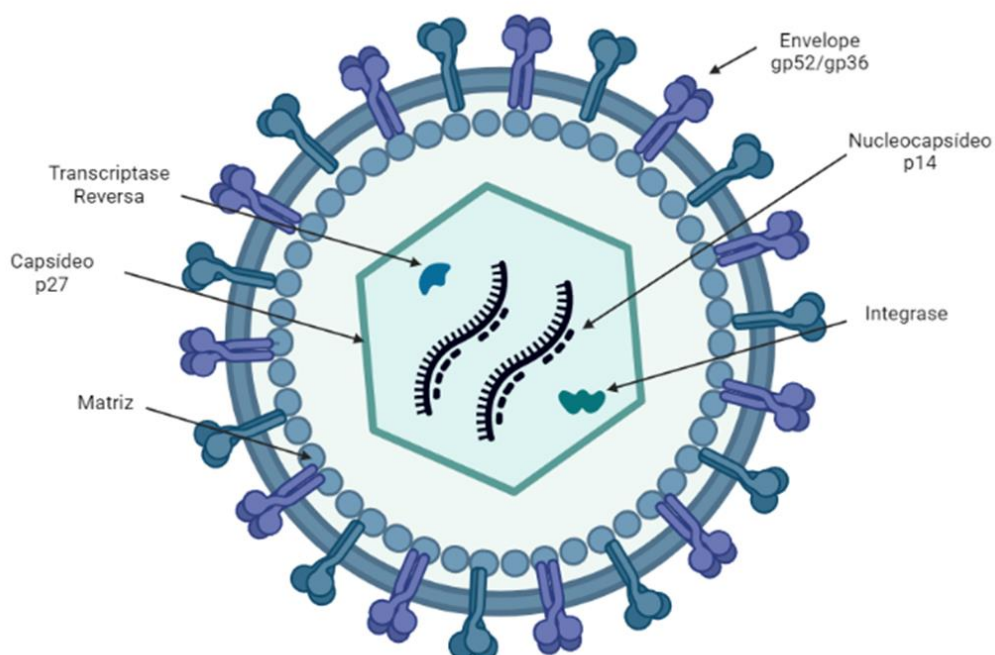
Dessa forma, a elucidação de associações entre infecções virais e tumores humanos são fundamentais para revelar possíveis alvos terapêuticos, fatores preventivos e preditores de resposta clínica de pacientes diagnosticados com esses tumores.

### 1.3.1 Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV)

O vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV) foi inicialmente associado ao desenvolvimento de CM em camundongos por BITTNER (1936). Em seu trabalho, Bittner denominou o vírus como um “fator do leite”, relacionando a presença de um filtrado extracromossomal com uma alta incidência de tumor mamário em linhagens de camundongos. A partícula viral do MMTV foi demonstrada por microscopia eletrônica em 1948 e é considerada o agente etiológico mais comum de CM e linfomas de células T em camundongos (LAWSON, GUNZBURG e WHITAKER, 2006; LAWSON *et al.*, 2006; MASON, 2000).

O MMTV é um vírus de RNA envelopado pertencente à família *Retroviridae* (CALLAHAN e SMITH, 2000). A partícula viral do MMTV possui 100nm de diâmetro, contendo em seu nucleocapsídeo duas cópias simples fita de RNA associadas a uma ribonucleoproteína, denominada p14, com uma simetria icosaédrica. Também associado a ribonucleoproteína, além do RNA, tem-se as enzimas transcriptase reversa e integrase. O nucleocapsídeo é formado pelas proteínas p27 e está ligado ao envelope viral por proteínas da matriz. O envelope é constituído por uma porção da membrana plasmática da célula hospedeira modificada com a inserção de proteínas codificadas pelo MMTV, como a proteína de superfície (gp52) e proteína transmembrana (gp36), ambas subunidades da gp72 (TERAMOTO, CARDIFF e LUND, 1977) (Figura 1).

**Figura 1** – Estrutura do Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV)



Partícula viral do MMTV é constituída por duas cópias simples fita de RNA associadas às proteínas (p) do nucleocapsídeo (p14). Além do RNA, tem-se as enzimas transcriptase reversa e integrase. O nucleocapsídeo é formado pelas proteínas p27 e está ligado ao envelope viral por proteínas da matriz. Já o envelope viral é constituído pelas glicoproteínas (gp) de superfície (gp52) e proteína transmembrana (gp36). Imagem criada com biorender.com. **Fonte:** o próprio autor.

O RNA viral possui regiões gênicas que codificam proteínas essenciais para a formação do vírion (Figura 2). A região *gag* codifica a protease viral, as proteínas do nucleocapsídeo (p27) e as nucleoproteínas (p14). A região *gag-pol* codifica as enzimas transcriptase reversa e integrase. Já a região *env* codifica as proteínas gp36 e gp52 (ROSS, 2008; SZENTIVANYI e FRIEDMAN, 2012). Além dessas regiões, o RNA do MMTV possui uma sequência repetitiva terminal longa (LTR), com aproximadamente 1.3kb, que codifica uma proteína viral acessória, denominada de superantígeno (SAg), sendo este essencial para o ciclo replicativo do vírus (ROSS, 2010).

**Figura 2** – Diagrama da estrutura do RNA do Vírus de Tumor Mamário de Camundongos (MMTV)



O RNA do MMTV possui regiões gênicas que codificam as proteínas para a formação da partícula viral, sendo elas a região repetitiva terminal longa (LTR), que codifica o superantígeno (SAg); a região gag, que codifica as proteínas da matriz (MA), do capsídeo (CA) e do nucleocapsídeo (NC); a região pol, que codifica as enzimas protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN); e a região env, que codifica as glicoproteínas que constituem as proteínas de superfície (SU) e transmembrana (TM). Imagem criada com biorender.com. **Fonte:** NARTEY *et al.* (2014) modificado.

O MMTV possui duas formas de transmissão já bem estabelecidas: a transmissão vertical ou endógena e a transmissão horizontal ou exógena (CZARNESKI, 2003). A transmissão vertical ou endógena ocorre quando o MMTV é transmitido como uma herança mendeliana para os descendentes como DNA proviral. Algumas linhagens de camundongos já 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, devido às alterações genéticas no genoma viral, os provírus endógenos não codificam vírus funcionais (MASON, 2000; ROSS, 2008).

A transmissão horizontal ou exógena, acontece através do leite materno contendo partículas virais do MMTV, quando o vírus alcança as células M, presentes nas placas de Peyer. As proteínas do envelope do MMTV se ligam aos receptores do tipo Toll 4 (TLR4) das células dendríticas presentes na região, resultando na migração para o linfonodo. Após infectar estas células, o MMTV codifica o SAg que é apresentado na superfície celular por meio da molécula do MHC de classe II, ativando células T. Em contrapartida, estes linfócitos proliferam, ativam as células B que produzem citocinas, e estas estimulam e recrutam novas células dendríticas, linfócitos B e T, estabelecendo assim um reservatório de células infectadas (ROSS, 2008; ROSS, 2010). A entrada do MMTV na célula também pode acontecer através do receptor de transferrina 1 (TfR1) (ROSS *et al.*, 2002), explicando em parte 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 *et al.*, 1989; SCHULMAN *et al.*, 1989).

Dessa forma, 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 durante a puberdade e gestação (ROSS, 2008). 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 e BLACKSTONE, 1990). Tal fato se deve a elementos responsivos hormonais presentes no gene *LTR*, que promovem a transcrição do genoma viral (MCGRATH e JONES, 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 agir como um mutagênico de inserção ou na ativação da transcrição de oncogenes próximos ao local de inserção proviral (CALLAHAN e SMITH, 2000; NUSSE, 1986). Alguns genes foram descritos na literatura por sofrerem uma reorganização pela integração do genoma do MMTV, sendo eles os genes da família *Wnt* (LEE *et al.*, 1995), da família do fator de crescimento de fibroblastos (*Fgf*) (PETERS *et al.*, 1989), da família *Notch* (DIÉVART, BEAULIEU e JOLICOEUR, 1999) e o gene que codifica o componente p48 do fator-3 de iniciação da tradução eucariótica (*eIF-3p48*) (ASANO, MERRICK e HERSHEY, 1997).

Com a elucidação do envolvimento do MMTV com o desenvolvimento de CM em camundongos, diversos grupos de pesquisa têm investigado a participação de um vírus na carcinogênese mamária humana. Alguns estudos indicaram a presença de sequências genéticas similares aos genes do MMTV em amostras biológicas de pacientes com CM, tendo recebido a denominação de *MMTV-like*. Apesar dos estudos desenvolvidos, o papel do *MMTV-like* no desenvolvimento do CM ainda permanece controverso na literatura.

### 1.3.2 Vírus do Tumor Mamário Humano (*MMTV-like*)

A hipótese de que um retrovírus homólogo ao MMTV possa estar envolvido no desenvolvimento do CM humano tem fascinado cientistas há anos. O interesse nesta hipótese foi renovado quando LIU *et al.* (2001) identificaram a sequência gênica completa do provírus em amostras de tecido mamário tumoral

humano, sendo essa sequência 95% homóloga à sequência do MMTV. Além disso, MELANA *et al.* (2007) isolaram partículas virais de culturas celular de CM humano, sendo que a estrutura viral foi caracterizada com alta homologia (95%) ao MMTV, revelando características de um vírus em fase de replicação.

O gene *env* do MMTV-*like* é representado por uma fase aberta de leitura (ORF) de aproximadamente 1,6kb, sendo 94-99% idêntica ao gene *env* do MMTV e, quando presente nas amostras analisadas, indica a presença do vírus (MOK *et al.*, 2008). Outra sequência bem caracterizada é a do gene do *LTR*, que codifica o SAg, e já foi identificada por sequenciamento em amostras de CM humano, sendo altamente homóloga a presente no MMTV (WANG *et al.*, 2004). Essas sequências gênicas foram encontradas em proporções variáveis nas populações, sendo que em alguns países a positividade para o MMTV-*like* foi de até 73,7% dos casos de CM geral (Tabela 3).

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

<b>País</b>	<b>Amostras</b>	<b>Resultados</b>	<b>Autor/Ano</b>
Arábia Saudita	Tecido (parafina) n= 101	Presença do gene <i>env</i> em 5,9% das amostras	AL DOSSARY, ALKHARSAH e KUSSAIBI (2018)
Argentina	Tecido n= 74	Presença do gene <i>env</i> em 31% das amostras	MELANA <i>et al.</i> (2002)
	Tecido (parafina) n= 45	Presença de sequência <i>env</i> em 42,2% das amostras	FORD <i>et al.</i> (2003)
	Tecido (parafina) n= 128	Presença do gene <i>env</i> em 40% das amostras	FAEDO <i>et al.</i> (2004)
	Tecido (parafina) n= 51 CDI e 2 CDIS	Gene <i>env</i> foi detectado em 78% amostras CDI e 100% amostras CDIS	FORD, FAEDO e RAWLINSON (2004)
Austrália	Tecido (parafina) n= 20 CDI e 22 CDIS	Gene <i>env</i> foi detectado em 75% amostras CDI e 23% amostras CDIS	LAWSON <i>et al.</i> (2004)
	Tecido (parafina) n= 59	Presença do gene <i>env</i> em 37,3% amostras	LAWSON <i>et al.</i> (2006)
	Tecido (parafina) n= 25	Presença do gene <i>env</i> em 36% das amostras	NARTEY <i>et al.</i> (2017)
	Tecido (parafina) n= 45	Presença do gene <i>env</i> em 27% das amostras	LAWSON <i>et al.</i> (2018)
Brasil	Tecido (fresco) n= 217	Presença do gene <i>env</i> em 18,9% das amostras	DE SOUSA PEREIRA <i>et al.</i> (2020)
Canadá	Tecido (parafina) n= 12	Genes <i>env</i> e <i>LTR</i> em 50% das amostras	ETKIND <i>et al.</i> (2004)
	Tecido n= 131	Presença do gene <i>env</i> em 16,8% das amostras	LUO <i>et al.</i> (2006)
China	Tecido (parafina) n= 119	Gene <i>env</i> foi encontrado em 17,65% amostras de câncer de mama	WANG <i>et al.</i> (2021)
Coreia do Sul	Tecido (fresco) n= 128	Gene <i>env</i> foi encontrado em 9,4% amostras de câncer de mama	SEO <i>et al.</i> (2019)

Croácia	Tecido (parafina) n= 70	Material genético do MMTV-like foi encontrado em 7% das amostras	GUPTA <i>et al.</i> (2021)
Estados Unidos	Tecido (fresco e congelado) n= 314	Presença do gene <i>env</i> em 38,5% das amostras	WANG <i>et al.</i> (1995)
	Tecido (congelado) n= 73	Presença do gene <i>env</i> em 37% das amostras	ETKIND <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> (2001)
	Tecido (parafina) n= 106	Presença do gene <i>env</i> em 30,1% das amostras	MELANA, HOLLAND e POGO (2001)
Estados Unidos	Tecido (congelado) n= 65	Presença do gene <i>LTR</i> em 41,5% das amostras	WANG, Y; <i>et al.</i> (2001)
	Tecido (parafina e congelado) n= 29	Gene <i>env</i> foi encontrado em 62% amostras de CM gestacional	WANG <i>et al.</i> (2003)
	Tecido n= 60	Presença do gene <i>env</i> em 71,5% das amostras	POGO, HOLLAND e LEVINE (2010)
Egito	Tecido (fresco) n= 30 CMH e 50 CME	Sequências do gene <i>env</i> foi identificada em 76% dos CME e 70% dos CMH	LOUTFY <i>et al.</i> (2021)
	Tecido (fresco e parafina) n= 80	Presença do gene <i>env</i> em 7,5% das amostras de parafina e em 70% das amostras de tecido fresco	METWALLY <i>et al.</i> (2021)
Irã	Tecido (parafina) n= 59	Presença do gene <i>env</i> em 32,2% das amostras	SHARIATPANAHI <i>et al.</i> (2017)
	Tecido (parafina) n= 69	Presença do gene <i>env</i> em 37,7% das amostras	POGO <i>et al.</i> (1999)
Itália	Tecido (congelado) n= 45	Presença do gene <i>env</i> em 33% das amostras	ZAMMARCHI <i>et al.</i> (2006)
	Tecido (parafina) n= 49 CDIS e 20 CDI	Sequências <i>env</i> foram encontradas em 82% de CDIS e em 35% de CDI	MAZZANTI <i>et al.</i> (2011)
	Tecido (parafina)	Sequências genéticas foram	NACCARATO <i>et</i>

	n= 47 CMH e 56 CME	identificadas em 30,3% dos CME e 4,2% dos CMH	<i>al. (2019)</i>
Jordânia	Tecido (parafina) n= 100	Presença do gene <i>env</i> em 11% das amostras	AL HAMAD <i>et al.</i> (2020)
Marrocos	Tecido (parafina) n= 42	Presença do gene <i>env</i> em 57,14% das amostras	SLAOUI <i>et al.</i> (2014)
México	Tecido (congelado) n= 458	12,4% amostras foram positivas para gene <i>env</i>	CEDRO-TANDA <i>et al.</i> (2014)
Myanmar	Tecido (parafina) n= 58	Presença da sequência do gene <i>env</i> em 1,7% das amostras	SAN <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 <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, SURRIYA e SADIA (2017)
	Tecido (parafina) n= 105	Presença do gene <i>env</i> em 65,7% das amostras	KHALID <i>et al.</i> (2021)
Tunísia	Tecido (parafina) n= 38	Presença do gene <i>env</i> em 73,7% das amostras	LEVINE <i>et al.</i> (2004)
	Tecido (congelado) n= 122	Presença do gene <i>env</i> em 13,9% das amostras	HACHANA <i>et al.</i> (2008)
Vietnã	Tecido (parafina) n= 120	A sequência <i>env</i> foi encontrada em 0,8% das amostras	FORD <i>et al.</i> (2003)

CDIS: carcinoma ductal *in situ*; CDI: carcinoma ductal invasivo; CI: carcinoma invasivo; CME: câncer de mama esporádico; CMH: câncer de mama hereditário.

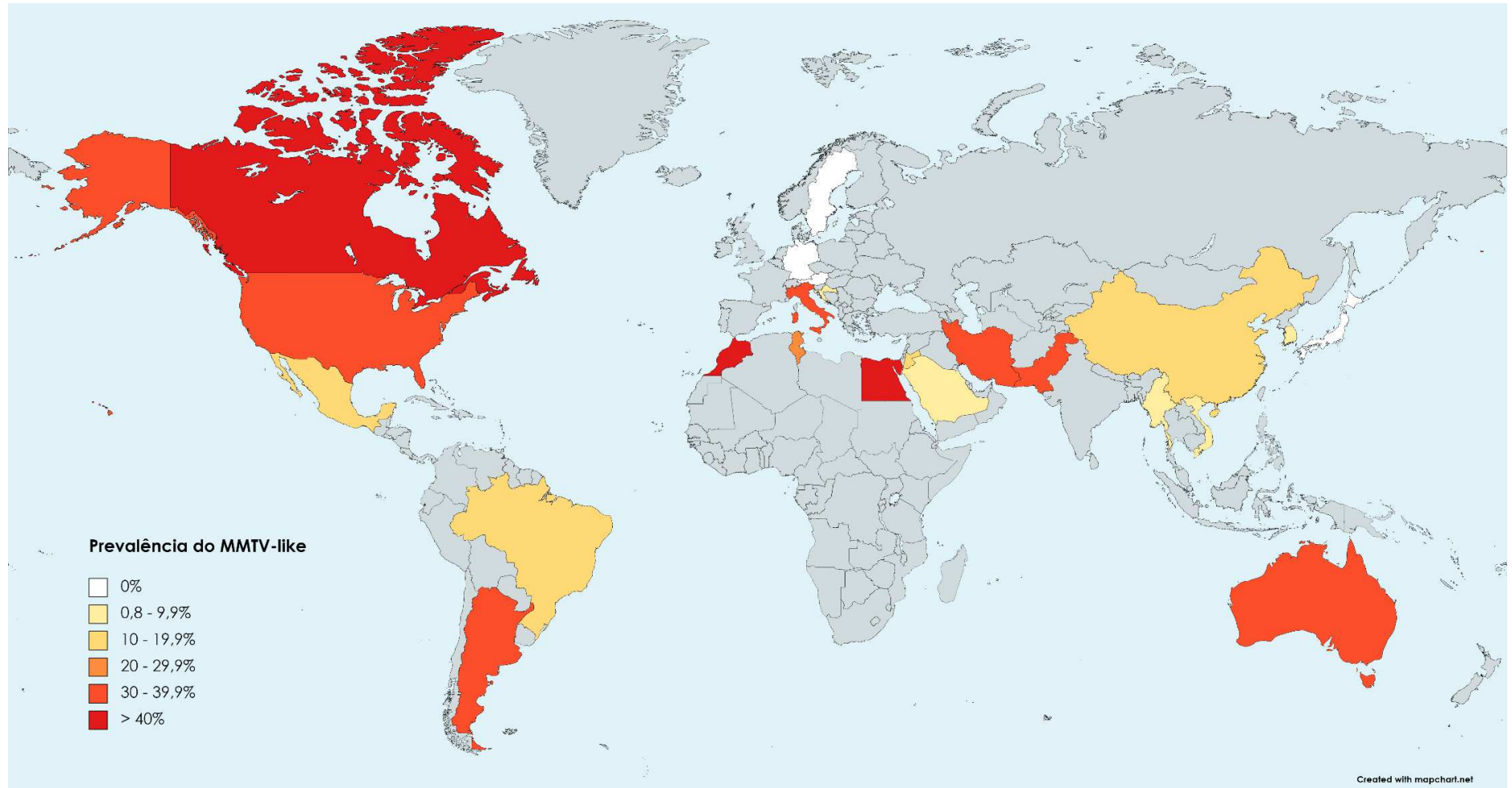
Apesar desses estudos, a participação do MMTV-like no desenvolvimento do CM permanece controversa, devido ao crescente número de estudos internacionais cujos resultados foram negativos para a presença do vírus em amostras de tecido tumoral mamário. Um estudo realizado por WITT *et al.* (2003) em pacientes austríacas com CM não encontrou a sequência correspondente ao gene *env* em 50 amostras de DNA de tecido mamário tumoral humano, nem em 22 linhagens celulares, incluindo a MCF-7, que foi previamente descrita como controle positivo nas reações em cadeia da polimerase (PCR). Em um outro estudo, com a população sueca, BINDRA *et al.* (2007) tentaram por meio de PCR quantitativo demonstrar a presença do material genético do vírus em amostras de 18 pacientes

com CM e 11 controles livres de neoplasia, bem como amostras de sangue periférico, e nenhuma das amostras foram positivas para o DNA ou RNA do MMTV-*like*. Resultados similares foram encontrados em outras populações, como na japonesa (FUKUOKA *et al.*, 2008), na alemã (FRANK *et al.*, 2008), na iraniana (AHANGAR OSKOUEE *et al.*, 2014; TABRIZ *et al.*, 2013) e na mexicana (MORALES-SANCHEZ *et al.*, 2013).

As controvérsias também podem ser observadas em trabalhos realizados por pesquisadores analisando a população de um mesmo país. Tal fato foi observado em um estudo com mulheres australianas, no qual 42 amostras de tecido tumoral incluídas em parafina foram utilizadas para detectar a sequência *env* do MMTV-*like*, sendo que nenhuma amostra foi positiva (PARK *et al.*, 2011), e tais achados parecem inconsistentes com resultados prévios de amostras da população australianas (FORD, FAEDO e RAWLINSON, 2004; FORD *et al.*, 2003; LAWSON *et al.*, 2006; NARTEY *et al.*, 2017).

Uma das principais explicações para os resultados divergentes na literatura seria a variação natural da prevalência de infecções virais entre as diferentes populações em todo mundo. No caso do MMTV-*like*, as variações populacionais disponíveis na literatura podem ser observadas na figura 3, na qual a prevalência foi estimada dividindo o número total de amostras positivas para o gene *env* pelo número total de amostras testadas em cada país. As discrepâncias também podem ocorrer pelo uso de diferentes técnicas para a detecção viral, variação nos procedimentos experimentais, espécimes biológicas empregadas, qualidade das amostras e sequências gênicas do MMTV-*like* estarem presente em pouco número de cópias (MAZZANTI *et al.*, 2011).

**Figura 3** – Distribuição mundial da detecção do Vírus do Tumor Mamário Humano (MMTV-*like*) em amostras de câncer de mama



A prevalência de MMTV-*like* (%) foi estimada dividindo-se o número total de amostras positivas para o gene *env* pelo número total de amostras testadas em cada país. Mapa gerado usando o software Mapchart, disponível online em: <https://mapchart.net/>. **Fonte:** o próprio autor

As sequências gênicas do MMTV-*like* já foram detectadas em diversos materiais biológicos humanos, além do tecido mamário tumoral. MELANA *et al.* (2007) demonstraram a presença de partículas do MMTV-*like*, por microscopia eletrônica, em cultura de células primárias isoladas de ascites ou efusões pleurais de pacientes com CM metastático. Por outro lado, JOHAL *et al.* (2011) verificaram a presença da sequência do gene *env* do MMTV-*like* em amostras de leite de lactantes saudáveis. O material genético do MMTV-*like* também foi encontrado em amostras de saliva de adultos, crianças e pacientes com CM (MAZZANTI *et al.*, 2015). No trabalho de TOMANA *et al.* (1981), soro de pacientes foram analisados para a presença de anticorpos contra antígenos gp52 e gp34 do MMTV-*like*, através da técnica de imunofluorescência indireta, e foi encontrada reação positiva em pacientes com CM, com tumores benignos da mama, outros tipos de malignidades mamárias e mulheres livres de neoplasia.

Em outro estudo investigando a presença do vírus em leite humano, as sequências de DNA e RNA correspondentes ao gene *env* e a junção *env/LTR* foram detectadas em amostras de leite de mulheres lactantes que apresentaram alto risco de desenvolvimento do CM por terem feito, em algum momento da vida, biópsia mamária, dando suporte à hipótese de transmissão exógena, assim como ocorre nos camundongos. Além disso, a presença das sequências de RNA nas amostras analisadas implicam na presença de partículas virais do MMTV-*like* no leite (NARTEY *et al.*, 2014).

Já STEWART *et al.* (2000) associaram uma maior incidência de CM humano em regiões onde a espécie de camundongo *Mus domesticus*, que abriga maior carga viral do MMTV, está presente, sugerindo que os seres humanos sejam infectados através do contato com camundongos. Aliás, o paralelo entre o CM humano MMTV-*like* positivo e CM murino MMTV positivo tem sido outro ponto de intenso debate na literatura, principalmente com relação ao tecido afetado (FINKE, LUTHER e ACHA-ORBEA, 2002; MANT e CASON, 2005; MASON, GILADY e MACKEY, 2011). Entretanto, estudos tem demonstrado similaridade histológica entre tumores humanos positivos para MMTV-*like* e cânceres de mama MMTV positivos em camundongos (LAWSON *et al.*, 2018; LAWSON *et al.*, 2017; LAWSON *et al.*, 2006).

O trabalho de STEWART *et al.* (2000) estimulou o surgimento de outras hipóteses de transmissão, principalmente envolvendo animais domésticos,

como os gatos. Tal hipótese foi apontada na revisão de SZABO, HAISLIP e GARRY (2005), na qual os gatos poderiam adquirir o vírus ao se alimentarem de camundongos que abrigam cepas infecciosas de MMTV e transmitir para os humanos através do contato com secreções dos felinos, como a saliva de forma direta ou de forma indireta, através dos pelos dos animais por exemplo. Além dos gatos, os cachorros também foram apontados como possíveis transmissores de cepas do MMTV capazes de infectar humanos. Um estudo de HSU *et al.* (2010) demonstrou a presença de sequências gênicas correspondentes aos genes *env* e *LTR* em tumores mamários malignos de cães e gatos, demonstrando que esses animais de companhia, que mantem contato diário com os humanos, podem contribuir para a transmissão viral.

A possível contaminação com material murino e sequências endógenas de betaretrovírus foi cuidadosamente excluída por um estudo recente de LESSI *et al.* (2020), no qual foi investigada a presença de sequências semelhantes ao MMTV em cálculos dentários, que são acúmulos de saliva, de crânios antigos. As sequências semelhantes a MMTV foram identificadas nos cálculos de 6 indivíduos datados da Idade do Cobre, revelando que essas sequências estão presentes na espécie humana há pelo menos 4.500 anos. Os autores sugerem que esta observação, juntamente com todos os dados presentes na literatura, demonstram a existência de um betaretrovírus exógeno humano possivelmente derivado de uma transmissão cruzada de espécies que ocorreu em tempos pré-históricos, com consequente disseminação inter-humana.

A possibilidade de um agente ambiental como fator comum no desenvolvimento de CM foi explorada e caracterizada no estudo realizado por ETKIND, STEWART e WIERNIK (2008). Neste estudo, pai, mãe e filha foram diagnosticados com carcinoma mamário metastático para os linfonodos axilares e apresentaram, nos tecidos malignos, sequências semelhantes aos genes *env* e *LTR*. As sequências amplificadas do gene *env* foram consideradas 98 a 99,6% homólogas às sequências *env* do MMTV encontradas nas linhagens murinas GR, C3H e BR6.

Já a associação entre a presença do MMTV-like e o desenvolvimento do CM humano foi reforçada pelo estudo de NARTEY *et al.* (2017), no qual a sequência de DNA correspondente ao gene *env* do MMTV-like foi identificada em 5 lesões mamárias benignas. Tais amostras foram coletadas no período de 1 a 11 anos antes do diagnóstico do CM dessas pacientes. As amostras

de tecido mamário tumoral também foram consideradas positivas para a sequência gênica do MMTV-*like*.

É importante ressaltar que, embora nenhum betaretrovírus humano conhecido esteja circulando em humanos hoje em dia, a busca pelo MMTV-*like* no DNA humano pode ser dificultada pela presença de retrovírus endógenos humanos (HERVs) (ONO *et al.*, 1986). HERVs são remanescentes de infecções retrovirais em células germinativas, o que compõe cerca de 8% do genoma humano, e podem estar relacionados à patogênese de alguns tipos de câncer, como melanoma (LI *et al.*, 2010), câncer de ovário (WANG-JOHANNING *et al.*, 2007), entre outros. O genoma humano abriga um supergrupo semelhante ao betaretrovírus, chamado HERV-K, descrito quando sequências humanas semelhantes ao MMTV exógeno foram encontradas (CALLAHAN *et al.*, 1982). O supergrupo HERV-K atualmente abrange 10 grupos HERV distintos, todos compartilhando semelhanças de sequências com MMTV. Conseqüentemente, eles foram chamados de HML (*human MMTV-like*) seguido por um número de 1 a 10 (GRANDI, PISANO e TRAMONTANO, 2019).

Tem sido demonstrado que diferenças entre as sequências do MMTV-*like* e HERV são suficientes para distinguir ambas usando as técnicas de PCR (MANT *et al.*, 2004; MASON, GILADY e MACKEY, 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 MMTV-*like* (LIU *et al.*, 2001). Comparações semelhantes foram realizadas por WANG, Y. *et al.* (2001), obtendo uma homologia de 54% entre as sequências MMTV-*like* presentes nas amostras humanas e a sequência do HERV-K10, que é considerado o protótipo de sequências endógenas com similaridade ao MMTV.

Em relação às correlações entre a presença do gene *env* do MMTV-*like* no tecido tumoral e características clínico-patológicas do CM, a meta-análise de WANG *et al.* (2014) não demonstrou associação entre a presença do *env* do MMTV-*like* e expressão de RE, RP, HER2, p53 ou grau histológico. No entanto, o trabalho publicado por nosso grupo demonstrou, nos subtipos Luminal B e HER2 superexpresso, correlações entre a presença do gene *env* MMTV-*like* no tecido tumoral e parâmetros clínico-patológicos indicativos de melhor prognóstico, como menor tamanho do tumor, menor estadiamento TNM e menor frequência de

metástase em linfonodos. Nossos resultados sugerem que MMTV-*like* pode exibir efeitos específicos de subtipo em CM e reforçam a necessidade de considerar os subtipos de CM como entidades separadas ao investigar biomarcadores (DE SOUSA PEREIRA *et al.*, 2020).

É possível observar que o envolvimento do MMTV-*like* na patogênese do CM humano vem sendo evidenciado na literatura com o passar dos anos. Entretanto, os possíveis mecanismos do MMTV-*like* envolvidos no desenvolvimento do CM permanecem desconhecidos.

#### 1.4 ENZIMA DE EDIÇÃO DE MRNA DE APOLIPOPROTEÍNA B, SEMELHANTE A POLIPEPTÍDEO CATALÍTICO 3 (APOBEC3)

O câncer necessita de mutações no genoma celular para que ocorra a transformação de uma célula normal em uma célula maligna. Assim, para prevenir a iniciação tumoral e compreender a biologia do câncer, é necessário que se identifiquem os processos e fontes de mutações (ALEXANDROV e STRATTON, 2014). De acordo com a origem, as mutações podem ser classificadas como exógenas, induzidas por agentes exteriores à célula, e endógenas, geradas por mecanismos inerentes à célula (HARRIS, BURNS e LEONARD, 2015).

O padrão de mutações em uma célula tumoral pode revelar a origem dessas mutações. Por exemplo, as transições de citosina (C) para timina (T) em sítios de dipirimidinas indicam mutações induzidas por radiação ultravioleta (UV), enquanto conversões de guanina (G) para T são indicativas da ação do tabaco (HOLLSTEIN *et al.*, 2016). Nos últimos anos, tem sido evidenciado um padrão de mutação induzido pela ação de enzimas com atividade citidina deaminases, como as enzimas da família das APOBECs (REBHANDL *et al.*, 2015).

A família das APOBECs em humanos engloba as seguintes enzimas: a citidina desaminase induzida por ativação (AID), a APOBEC1, a APOBEC2, a subfamília APOBEC3 e a APOBEC4. Tais enzimas catalisam a conversão de C em uracila (U) em sequências específicas DNA e/ou RNA, sendo que, até o momento, a APOBEC2 e a APOBEC4 são as únicas representantes dessa família que não apresentam atividade citidina deaminase confirmada (MARINO *et al.*, 2016; OKUYAMA *et al.*, 2012). As APOBECs possuem diversas funções fisiológicas, dentre elas a de mediar os processos de hipermutação e troca

de isotipo de imunoglobulinas em linfócitos B (AID) e de promover edição do RNA mensageiro da apolipoproteína B (APOBEC1). (REBHANDL *et al.*, 2015). A subfamília APOBEC3, composta por 7 enzimas diferentes (APOBEC3A-D, APOBEC3F-H), são induzidas durante infecções virais, principalmente pelos interferons (IFN) do tipo I, e, dessa forma, são capazes de promover a inativação de vírus por mutações em fitas simples de DNA durante a transcrição reversa (STAVROU e ROSS, 2015).

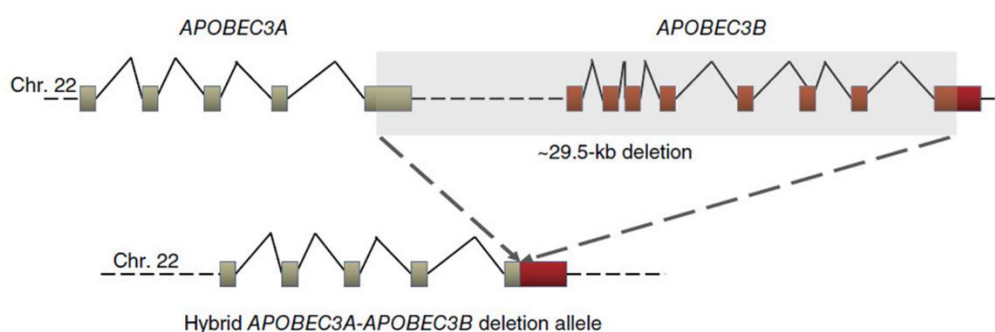
As mutações causadas pelas enzimas da família da APOBEC já foram detectadas em aproximadamente 75% dos tipos de câncer (ALEXANDROV *et al.*, 2020), sendo que essas mutações provavelmente influenciam a evolução tumoral por meio da ativação de oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (HENDERSON *et al.*, 2014). Diversos trabalhos demonstraram a presença de padrões de mutação consistentes com a atividade dessas enzimas no câncer de bexiga, de colo de útero, de pulmão, de cabeça e pescoço e no CM (BURNS, TEMIZ e HARRIS, 2013; ROBERTS *et al.*, 2013).

Análises anteriores já demonstraram que a APOBEC3A e a APOBEC3B eram capazes de induzir mutações em células mamárias, porém, com a demonstração da expressão nuclear da APOBEC3B, este seria o principal agente mutagênico no CM por ter uma maior possibilidade de acesso ao material genético da célula (BURNS *et al.*, 2013). No entanto, com o refinamento dos estudos baseados em expressão dos genes da APOBEC3A e APOBEC3B, sugeriu-se que a expressão APOBEC3A correlaciona-se fortemente com a carga mutacional associada com as enzimas citidina deaminase no CM, em comparação a expressão da APOBEC3B (CORTEZ *et al.*, 2019). Essa aparente contradição foi resolvida com a distinção dos padrões de mutações mediados por APOBEC3A e APOBEC3B no genoma do CM, sendo que a primeira enzima tem preferência por sítios YTCA (onde Y representa C ou T) e a segunda reconhece sítios RTCA (onde R representa A ou G), o que indicou que a APOBEC3A é um agente mutagênico mais potente que a APOBEC3B (CHAN *et al.*, 2015)

Uma variação genética que resulta na perda da sequência codificadora do gene da *APOBEC3B* já foi associada a uma maior carga de assinatura mutacional e a um aumento no risco de CM (NIK-ZAINAL *et al.*, 2014; XUAN *et al.*, 2013) (Figura 4), sugerindo que portadores do alelo deletado possuíam maior atividade da APOBEC, visto que a deleção gera uma isoforma da APOBEC3A

mais estável (CHAN *et al.*, 2015). Dessa forma, a deleção da *APOBEC3B* pode desempenhar um papel no desenvolvimento do CM. Estudos já apontaram a participação do polimorfismo de deleção do gene da *APOBEC3B* na suscetibilidade ao desenvolvimento do CM em populações asiáticas e de etnia caucasóide (KLONOWSKA *et al.*, 2017), porém não foi observada tal associação na população brasileira (VITIELLO *et al.*, 2020).

**Figura 4 – Representação do alelo de deleção híbrido *APOBEC3A-APOBEC3B*.**



Os genes *APOBEC3A* e *APOBEC3B* estão localizados em conjunto cromossomo 22. O polimorfismo envolve uma deleção da sequência codificadora de *APOBEC3B* (em destaque), fundindo a 3' UTR de *APOBEC3B* à 3' UTR de *APOBEC3A*. **Fonte:** NIK-ZAINAL *et al.* (2014)

Considerando os fatores prognósticos do tumor mamário, alguns estudos demonstraram uma correlação entre a expressão da *APOBEC3B* e a proliferação celular, a invasão linfática e venosa, a metástase linfática e o maior grau histopatológico do tecido tumoral (CESCON, HAIBE-KAINS e MAK, 2015; TSUBOI *et al.*, 2015). Um estudo de LEFEBVRE *et al.* (2016) demonstrou um aumento significativo na mutagênese mediada por *APOBEC* em tumores de mama metastáticos receptores hormonais positivos e HER2 superexpresso quando comparados com CM primário em estágio inicial. Além disso, a maior expressão de *APOBEC3B* influencia a resposta terapêutica, o que foi evidenciado no menor benefício clínico no uso de tamoxifeno em pacientes com tumores RE positivo (LAW *et al.*, 2016; SIEUWERTS *et al.*, 2014).

Apesar da importância da expressão das enzimas da família *APOBECs* em diversos tumores estar bem definida, pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam sua expressão. Por serem importantes no controle de infecções virais e induzidas por sinalização de respostas antivirais (SMITH *et al.*,

2012; VERHALEN *et al.*, 2016), é plausível que os vírus estejam envolvidos nesse processo.

Em um estudo realizado por OKEOMA *et al.* (2009) foi verificado que APOBEC3 de camundongo reduz a infecção pelo MMTV em seu hospedeiro natural, através da restrição da infecção em células dendríticas. Assim, o aumento dos níveis da APOBEC3 em camundongos pode levar a níveis aumentados de restrição viral. Além disso, em ratos, a APOBEC3 demonstrou inibir infecções de MMTV e replicação viral (MACMILLAN, KOHLI e ROSS, 2013; OKEOMA *et al.*, 2010; OKEOMA *et al.*, 2009).

O MMTV-*like* foi associado com melhor prognóstico do CM humano e um possível mecanismo que explicaria essa associação seria a ativação de respostas imunes antivirais no microambiente tumoral (DE SOUSA PEREIRA *et al.*, 2020). De fato, o CM mostra expressão aumentada de genes relacionados à inflamação e infecção viral, como interferon (IFN) (FERNANDEZ-COBO *et al.*, 2006). A resposta imune modulada pelos IFNs tipo I, que são classicamente ativados durante infecções virais, tem se mostrado um importante fator supressor no processo metastático (SLANEY *et al.*, 2013). Em conjunto, esses estudos sugerem que a família APOBEC, particularmente as enzimas APOBEC3A e APOBEC3B, podem desempenhar um papel central nos estágios iniciais da indução do CM (LAWSON, SALMONS e GLENN, 2018). Estudos adicionais são necessários para confirmar a possível ligação entre MMTV-*like*, as enzimas da família da APOBEC3 e o desenvolvimento do CM.

## 1.5 INTERFERON-GAMA

Os IFN são proteínas com funções imunomodulatórias, citostáticas e citotóxica, consideradas importantes na resposta antiviral. Envolvidos tanto na resposta imune inata como na adaptativa, participam e modulam também a resposta imune do hospedeiro frente aos tumores (SELIGER, RUIZ-CABELLO e GARRIDO, 2008). São reconhecidos três tipos distintos de IFNs, os tipos I, II e III, baseados na sua estrutura proteica, receptor ao qual se ligam e atividades biológicas (DONNELLY, RAYMOND P. e KOTENKO, SERGEI V., 2010).

A família IFNs do tipo I possuem diversas funções na defesa antiviral, dentre elas a capacidade de limitar a propagação do vírus; modular a

resposta imune inata, promovendo a apresentação de antígenos e a atividade de células *natural killers* (NK) enquanto restringe as vias pró-inflamatórias e a produção de citocinas; ativam o sistema imune adaptativo, promovendo o desenvolvimento de células T de alta afinidade e da resposta de células B, com subsequente produção de memória imunológica (DONNELLY, R. P. e KOTENKO, S. V., 2010). Já a família do IFN do tipo II possui apenas um membro, o IFN- $\gamma$ , que possui similaridade funcional, porém não estrutural (SEN, 2001).

A resposta inicial às infecções virais consiste na indução de altos níveis de IFNs tipo I. Após essa primeira fase, uma segunda onda de citocinas é produzida e secretada, sendo elas o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina (IL) -6, a IL-12 e o IFN- $\gamma$ . O IFN- $\gamma$  é produzido apenas pelas células do sistema imunológico, sendo as principais fontes as células NK e os linfócitos T. Agentes infecciosos, como os vírus, desencadeiam a produção de IL-12 por macrófagos, que por sua vez promovem a síntese de IFN- $\gamma$ . A produção de IFN- $\gamma$  é aumentada por IL-1, IL-2, fatores de crescimento, estrogênio e o próprio IFN- $\gamma$  e é inibida por glicocorticóides, fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e IL-10 (SEN, 2001).

Com a identificação do IFN- $\gamma$ , foi evidenciado o receptor na superfície celular para esta citocina. A cadeia  $\alpha$  do IFN- $\gamma$ R, também conhecida como IFN- $\gamma$  R1 ou CD119, foi o primeiro componente do receptor a ser elucidado. Embora se ligue ao IFN- $\gamma$  com afinidade relativamente alta, o IFN- $\gamma$  R1 sozinho é incapaz de mediar as respostas biológicas do IFN- $\gamma$  (HEMMI *et al.*, 1989). Estudos subsequentes levaram à identificação de um fator acessório (AF-1), também conhecido como cadeia  $\beta$  do receptor ou IFN- $\gamma$ R2, como a proteína necessária para dotar uma célula com a capacidade para responder ao IFN- $\gamma$  (FISCHER *et al.*, 1990). Resíduos citoplasmáticos específicos de ambas as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do IFN- $\gamma$ R são críticos para a transdução do sinal de IFN- $\gamma$  da superfície da célula para o núcleo através da ativação de vias de sinalização intracelular (FARRAR, FERNANDEZ-LUNA e SCHREIBER, 1991).

O efeito imunomodulador do IFN- $\gamma$  inspirou a utilização dessa citocina em tratamentos de diversas doenças, incluindo o câncer (MILLER, MAHER e YOUNG, 2009). Estudo realizado em linhagem celular de fibrosarcoma refratário ao IFN- $\gamma$  demonstrou o papel importante dessa citocina na detecção e eliminação de células tumorais (DIGHE *et al.*, 1994). Também foi sugerido que o IFN- $\gamma$  participa das funções de vigilância do tumor, aumentando a imunogenicidade das células

tumorais (KAPLAN *et al.*, 1998), principalmente através da regulação positiva dos genes do MHC classe I (WEBER e ROSENBERG, 1988). Além disso, o uso de IFN- $\gamma$  recombinante mostrou estar envolvido nos efeitos antiproliferativos (CHIN *et al.*, 1996; HOBEIKA *et al.*, 1999; PLATANIAS *et al.*, 1999), antiangiogênicos (BEATTY e PATERSON, 2001; COUGHLIN *et al.*, 1998; RÜEGG *et al.*, 1998) e pró-apoptóticos (CHAWLA-SARKAR *et al.*, 2003) contra as células tumorais.

Apesar de classicamente o IFN- $\gamma$  possuir um papel na vigilância imune tumoral, estudos sugerem que ele também pode ter efeitos protumorigênicos, ao moldar a imunogenicidade do tumor e promover o crescimento de células tumorais com propriedades evasivas do sistema imunológico (BERNABEI *et al.*, 2001; GARBE *et al.*, 1990; LOLLINI *et al.*, 1993; TANIGUCHI *et al.*, 1987).

O CM tem como um de seus mais notáveis componentes o estrogênio, que exerce sua atividade biológica, incluindo a proliferação celular, por meio de ações dos RE: RE $\alpha$  e RE $\beta$  (YUE *et al.*, 2013). Enquanto a expressão do RE $\alpha$  se restringe a células epiteliais mamárias, a expressão de RE $\beta$  é distribuída para, além dos núcleos de células epiteliais de glândulas saudáveis e malignas, núcleos de células estromais e endoteliais (SKLIRIS *et al.*, 2003).

O RE $\beta$  se apresenta como um fator de proteção no desenvolvimento de tumores endócrinos, como o CM, sendo também um modulador negativo do RE $\alpha$  (NILSSON *et al.*, 2001; PETTERSSON, DELAUNAY e GUSTAFSSON, 2000). NIU *et al.* (2015) sugerem que a correlação entre a expressão de IFN- $\gamma$  e RE $\beta$  corrobora com o papel sugestivo de proteção do IFN- $\gamma$  no comportamento maligno. Além disso, a atividade autócrina de IFN- $\gamma$  na linhagem de CM MCF-7 aumenta a expressão do RNAm do RE $\beta$ , elevando também a sensibilidade ao tratamento por tamoxifeno.

HEIMES *et al.* (2020) demonstraram que uma maior expressão da assinatura gênica de IFN- $\gamma$  está associada a melhor prognóstico do CM em uma coorte 461 pacientes. Adicionalmente, o impacto prognóstico dessa assinatura foi particularmente pronunciado nos subtipos luminais B, HER2-positivo e basaloide, sugerindo que a via do IFN- $\gamma$  desempenha um papel importante, em tumores altamente proliferativos.

## 1.6 PROTEÍNA SUPRESSORA TUMORAL P53

A origem e o desenvolvimento neoplásico são caracterizados por

diversas alterações, conforme apresentadas anteriormente (HANAHAN e WEINBERG, 2000; HANAHAN e WEINBERG, 2011). Dentre os principais grupos de genes que podem sofrer alterações durante o processo neoplásico estão os genes supressores tumorais (HANAHAN e WEINBERG, 2000). As proteínas codificadas pelos genes supressores tumorais fazem parte das vias de sinalização celular, atuando como reguladores da proliferação celular através do retardo da progressão do ciclo celular, do bloqueio da diferenciação ou da indução da apoptose (VERMA e TRIANTAFILLOU, 1998). Dessa forma, mutações que levam à inativação destes genes são capazes de liberar a célula da inibição imposta pelas proteínas codificadas pelos mesmos, levando à uma proliferação celular desordenada (WEINBERG, 1991).

Dentre os supressores tumorais conhecidos, a proteína p53 atua como uma reguladora de diversas vias de sinalização importantes para a célula. A ativação da proteína p53 se dá em resposta a diversas fontes de estresses celulares, como o próprio dano ao DNA celular, levando a um acúmulo da proteína na célula. A atividade supressora da p53 resulta na regulação transcricional de outros genes que estão envolvidos na parada do ciclo celular, na apoptose, no envelhecimento celular (senescência), no reparo de DNA e na diferenciação celular (BIEGING, MELLO e ATTARDI, 2014; HASHIMOTO, NAGANO e TANAKA, 2019; VAN HEEMST, MOOIJAART, BEEKMAN, SCHREUDER, DE CRAEN, BRANDT, ELINE SLAGBOOM, *et al.*, 2005). Além dessas atividades, a p53 é capaz de atuar regulando a expressão de genes que atuam no metabolismo. Dessa forma, quando ocorre uma mudança no metabolismo intracelular, a p53 é ativada, levando a célula a um estado de esgotamento de energia, com o objetivo de corrigir esse desbalanceamento metabólico. Após essa correção, a célula retorna ao estado de homeostasia (HASHIMOTO, NAGANO e TANAKA, 2019).

A proteína p53 também contribui com a resposta imunológica na tentativa de erradicar patógenos, como os vírus (RIVAS, AARONSON e MUNOZ-FONTELA, 2010), sendo capaz de ativar a expressão de diversos genes associados à resposta imune inata, como o gene do TLR3 e da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) (HACKE *et al.*, 2010; TAURA *et al.*, 2008). A transcrição do gene *TP53* é induzida pela sinalização dos IFNs do tipo I, o IFN- $\alpha$  e o IFN- $\beta$  (MUÑOZ-FONTELA *et al.*, 2008).

As mutações somáticas na proteína p53 são uma característica

frequente em grande parte dos tumores de ocorrência natural, estando presente em 50% dos tumores primários. Nos tumores de mama, pulmão e cólon podem ser observados em até 85% dos casos (HOLLSTEIN *et al.*, 1991). O alelo mutado leva à produção defeituosa da proteína p53, impedindo que ela se ligue ao DNA e ative a transcrição de genes. Diversos vírus, que já foram associados ao desenvolvimento tumoral, possuem mecanismos capazes de inibir, direta ou indiretamente, a atividade supressora tumoral da proteína p53 (COLLOT-TEIXEIRA *et al.*, 2004).

O gene que codifica a proteína p53, o *TP53*, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) (ISOBE *et al.*, 1986; LIU *et al.*, 2010). Diversos polimorfismos genéticos já foram identificados, sendo que o de maior destaque é o polimorfismo rs1042522 (Arg72Pro) e a sua relação com diversas neoplasias humanas tem sido alvo de investigação (KIETTHUBTHEW *et al.*, 2003).

O polimorfismo Arg72Pro está localizado no éxon 4, no códon 72, e é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), no qual ocorre a troca de uma guanina (G) por uma citosina (C), ocasionando alterações estruturais da proteína e, conseqüentemente, influenciando em sua atividade (BERGAMASCHI *et al.*, 2006; DUMONT *et al.*, 2003; THOMAS, M. *et al.*, 1999; THOMAS, MIRANDA *et al.*, 1999). Na presença da guanina no códon 72 (CGC), a sequência genética codifica o aminoácido arginina (Arg). Já quando ocorre a troca por uma citosina na mesma região (CCC), o aminoácido codificado é a prolina (Pro). Dessa forma, três genótipos diferentes deste polimorfismo podem ser observados: homocigoto GG (Arg/Arg), heterocigoto GC (Arg/Pro) e homocigoto CC (Pro/Pro) (MATLASHEWSKI *et al.*, 1987).

Diferentes características foram atribuídas para a presença dos aminoácidos Arg e Pro na proteína p53. Estudos demonstraram que a presença do aminoácido Arg estimula a apoptose, enquanto que a presença da Pro induz a bloqueio do ciclo celular e reparação do DNA (DUMONT *et al.*, 2003; PIM e BANKS, 2004; SIDDIQUE, M. e SABAPATHY, K. J. O., 2006). Pelo fato da Pro possuir um menor potencial para apoptose, a presença do alelo que codifica esse aminoácido em homocigose pode ser considerada mais oncogênica do que a presença do alelo que codifica a Arg em homocigose (VAN HEEMST, MOOIJART, BEEKMAN, SCHREUDER, DE CRAEN, BRANDT, SLAGBOOM, *et al.*, 2005).

O polimorfismo Arg72Pro já foi relacionado com maior risco de desenvolvimento de diferentes tipos de câncer (WHIBLEY, PHAROAH e

HOLLSTEIN, 2009), sendo que este polimorfismo apresentou uma relação importante com o desenvolvimento do CM (HOSSAIN *et al.*, 2017; SIDDIQUE, M. e SABAPATHY, K., 2006; VOGELSTEIN, LANE e LEVINE, 2000).

Estudos sobre possíveis mecanismos da resposta antiviral, incluindo o perfil de citocinas e a proteína p53, em indivíduos que apresentam as sequências gênicas do MMTV-*like* são escassos na literatura. Desta forma, este trabalho procurou pesquisar diferentes fatores que poderiam influenciar a susceptibilidade e/ou prognóstico da doença, enfatizando o caráter multifatorial do carcinoma mamário.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento e as implicações do estresse crônico, do vírus do tumor mamário humano (MMTV-*like*) e mecanismos da resposta imune antiviral em pacientes diagnosticadas com CM.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Artigo 1: Avaliar a associação dos estressores crônicos prévios ao diagnóstico de CM com o desenvolvimento dessa doença.

Artigo 2: Avaliar a associação dos genótipos do polimorfismo de deleção *APOBEC3B* (A3A/B) com a detecção do gene *env* do MMTV-*like* em pacientes com CM.

Artigo 3: Quantificar os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  e avaliar a associação desses níveis plasmáticos com a detecção do gene *env* do MMTV-*like* e parâmetros clínico-patológicos de pacientes diagnosticadas com CM.

Artigo 4: Avaliar o polimorfismo rs1042522 Arg72Pro no gene *TP53* e a associação dos genótipos com a presença do MMTV-*like* em pacientes com CM.

### 3 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta seção contém os quatro artigos científicos produzidos no desenvolvimento dessa tese. Sendo eles:

1. “An association between chronic life stressors prior to diagnosis of breast cancer”. Publicado na revista ***EXCLI Journal*** (**Fator de impacto: 4.068; Qualis Medicina II 2013-2016: B2**).

2. “Deletion of the *APOBEC3B* and detection of MMTV-like DNA in Brazilian breast cancer patients”. Não submetido

3. “Interferon-gamma plasma levels and presence of Mouse Mammary Tumor Virus-like: implications on the pathogenesis of breast cancer”. Não submetido.

4. “Association study between *TP53* gene polymorphism genotypes and detection of the MMTV-like *env* gene in Brazilian breast cancer patients.” Não submetido.

### 3.1 ARTIGO 1 – “AN ASSOCIATION BETWEEN CHRONIC LIFE STRESSORS PRIOR TO DIAGNOSIS OF BREAST CANCER”

*EXCLI Journal 2021;20:1370-1378 – ISSN 1611-2156*

*Received: June 18, 2021, accepted: August 24, 2021, published: August 31, 2021*

#### Original article:

### AN ASSOCIATION BETWEEN CHRONIC LIFE STRESSORS PRIOR TO DIAGNOSIS OF BREAST CANCER

Nathália de Sousa-Pereira<sup>1,\*</sup>, Mayara Bocchi<sup>1</sup>, Caroline Yukari Motoori-Fernandes<sup>1</sup>, Bruna Karina Banin-Hirata<sup>2</sup>, Luiz Gustavo Piccoli de Melo<sup>3</sup>, Karen Brajão de Oliveira<sup>4</sup>, Glauco Akelington Freire Vitiello<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Coral de Oliveira<sup>5</sup>, Clodoaldo Zago Campos<sup>3</sup>, Marla Karine Amarante<sup>1</sup>, Maria Angelica Ehara Watanabe<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of DNA Polymorphisms and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Paraná, Brazil
- <sup>2</sup> Laboratory of Immunogenetics, Department of Basic Health Sciences, Biological Sciences Center, Maringa State University, Paraná, Brazil
- <sup>3</sup> Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil
- <sup>4</sup> Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, Paraná, Brazil
- <sup>5</sup> Department of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Londrina, Brazil

\* **Corresponding author:** MSc. Nathália de Sousa Pereira, Laboratory of DNA Polymorphisms and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, Londrina State University, PR445, Km 380 Celso Garcia Cid highway, Londrina, PR 86057-970, Brazil. Telephone: +55 43 3371-5630, E-mail: [nathaliasousapereira@gmail.com](mailto:nathaliasousapereira@gmail.com)

<http://dx.doi.org/10.17179/excli2021-4005>

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### ABSTRACT

The clinical course of breast cancer (BC) and survival depend on a wide range of risk factors. From the psychosomatic point of view, BC is one of the most studied type of cancer but there is no evidence available for this relation. Therefore, in the present study we evaluate the impact of chronic life stressors in BC patients. A total of 100 BC patients were invited to participate in an interview, when information about social parameters and emotional changes in the period prior to diagnosis were collected. The emotional changes were evaluated by the Holmes and Rahe's Stress Scale, which analyzes the difficulty required for a person to readjust to society after significant changes in their life. Clinicopathological parameters were obtained from the medical records. For all data, the level of significance adopted was  $p < 0.05$ . It was observed that 55.2 % of the patients have a medium and 13.8 % were at high risk for disease development related to stressful events in the period prior to the BC diagnosis. The highest stress levels were presented by separated, divorced, or widowed patients compared to married ( $p < 0.01$ ) and single ( $p = 0.037$ ) patients. The high-risk (HR) group had a lower proportion of positivity for estrogen receptor when compared to the low (LR) and moderate risk (MR) groups ( $p = 0.001$ ). In addition, a binary logistic regression analysis was performed, and we found that the relationship between the estrogen receptor and the HR of chronic stress was independently associated with the histological type of BC and lymph nodes involvement. The relationship of stressful life experiences and BC is not well established, so our study collaborates with the literature to demonstrate the importance of stress as a factor associated with the development of BC.

**Keywords:** Breast carcinoma, oncology, risk factor, stress, chronic

## INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most common malignant tumor in women, excluding cases of non-melanoma skin cancer. The estimated global incidence of BC was 2.3 million new cases in 2020 (Sung et al., 2021). An estimated 66,280 new cases of BC are expected in Brazil for each year of the 2020-2022 triennium (INCA, 2019).

BC has high clinical, morphological and biological heterogeneity and is associated with different gene expression profiles, enabling the identification of distinct molecular subtypes, with prognostic factors and specific therapeutic targets (Cirqueira et al., 2011). This molecular classification is made using the following markers in the clinical routine: estrogen receptors (ER), progesterone receptors (PR), overexpression of type 2 human epidermal growth factor receptor (HER2) and the cellular proliferation index Ki-67. Thus, from the gene expression profiles of these markers, four molecular subtypes were initially identified: Luminal-A (LA; ER/PR+ HER2-), Luminal-B (LB; ER/PR+ HER2+), HER2-enriched (HER2; ER- PR- HER2+) and triple-negative (TN; ER- PR- HER2-) (Cirqueira et al., 2011; Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001).

Despite having a relatively good prognosis, when diagnosed in the early stages and treated in a timely manner, BC is detected in more advanced stages in low- and middle-income countries, significantly reducing patient survival (INCA, 2017). The clinical course of BC and overall survival vary for each patient and depend on a number of risk factors, such as age, family history, early menarche, late menopause, advanced age in the first pregnancy, nulliparity and hormone replacement therapy (Ban and Godellas, 2014; Brewer et al., 2017; Horn et al., 2013; Siegel et al., 2017). Lifestyle, such as excessive use of alcohol and a high-fat diet, were identified as important risk factors (Jung et al., 2016; Makarem et al., 2013).

Since ancient times, there has been a belief that psychological factors, such as traumatic emotional experiences, could affect the susceptibility and course of a disease (O'Leary, 1990). One of the main explanations for this phenomenon would be the theory of allostatic overload/bankruptcy. Allostasis is related to the

maintenance of an intensely complex and dynamic internal balance of the different biological systems, functioning as “circuits interconnected in parallel”, which are activated concomitantly and can be influenced by both intrinsic and extrinsic stress factors (Goldstein and Kopin, 2007; McEwen, 2000; Sterling and Eyer, 1988). When these stress modulation systems fail, that is, they suffer from a state of allostatic overload, they promote chronic activation of the physiological response to stress, such as, a hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, increased pro-inflammatory cytokines and a state of chronic hypercortisolism. Changes can generate irreparable damage to the individual and lead to the development of diseases related to chronic stress, such as cancer, psychiatric disorders and cardiovascular diseases (McEwen, 1998; McEwen and Gianaros, 2010).

BC is one of the most studied types of cancer from the psychosomatic point of view, mainly because it is one of the most prevalent in the female population. Cormanique et al. (2015), using the Self-Reporting Questionnaire (SRQ-20) scale, developed by the World Health Organization (WHO) to screen for psychiatric disorders, showed that women with a previous history of chronic stress has a higher prevalence of the HER2 BC subtype. Dourado et al. (2018) showed an association between stressful life events after BC diagnosis, using the Holmes and Rahe Stress Scale, and the development of metastasis. However, Santos et al. (2009), through a meta-analysis, concluded that stress-producing life events would not be associated with risk of BC.

Although there is much discussion and controversial results about the role of stressful life events and cancer, little is known about the impact that past chronic life stressors have on determining BC and its respective molecular subtypes. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the association of previous chronic stressors to the BC diagnosis, assessed by the Holmes and Rahe Stress scale, and their respective molecular subtypes in women monitored at Londrina Cancer Hospital (LCH), Paraná, Brazil.

## METHODS

### *Sample selection*

The present study was approved by the Ethics Committee of the Londrina State University, Paraná, Brazil, agreeing with the National Commission of Ethics in Research (CAAE: 68744617.0.0000.5231). The BC patients were invited, randomly, to participate in this project during the clinical care in LCH and the informed consent form was signed by all patients prior to data collection.

### *Data collection*

A total of 100 BC patients participated in an interview after medical care at LCH, with the objective of collecting information about social parameters, such as marital status, ethnicity, number of children and job occupation. In addition, patients were asked about events that marked emotional changes in a period prior to BC diagnosis, which were evaluated by the Holmes and Rahe Stress Scale (Holmes and Rahe, 1967). This scale analyzes the difficulty required for the person to readjust to society after significant changes in their life, which generate emotional distress leading to various diseases. The instrument consists of a list of 42 events, such as the death of a spouse or a close relative, divorce, marital separation, professional changes, among others. The instrument measures the intensity and duration of the time needed to adapt to a life event and is based on the concept that any change is considered a stressful factor. Each event has a score given by the authors of the instrument, ranging from 11 to 100 points.

During the interview, the patients reported several situations that caused them some emotional change and all of them could be identified in the events presented by the Holmes and Rahe Stress scale. For the statistical analyses, the final score of each patient was considered, which consisted of the sum of the points of each event reported by them. The Holmes and Rahe Stress scale were categorized into 3 groups for risk of disease development associated with chronic stress levels: low risk (LR) (final score lower than 150), medium risk (MR) (final score 150-299) and high risk (HR) (final score greater than 300).

The clinicopathological parameters were obtained from the medical records of these patients and the immunohistochemical analysis for the HER2, ER, PR and Ki-67 markers was performed at the Laboratory of Clinical Pathology of the LHC, following a standard protocol (Hammond et al., 2010; Wolff et al., 2013). Of the patients analyzed, 95 were classified according to the expression of the markers in specific molecular BC subtypes.

### *Statistical analysis*

The data obtained in the interviews were used to evaluate the distribution and relation of social parameters and clinicopathological parameters with the levels of chronic stress before BC diagnosis. Initially, univariate analyzes were performed and, subsequently, multivariate analyzes to rule out possible confounding factors, respecting the criteria for each statistical test. For all data the significance level adopted was  $p < 0.05$ . The SPSS 22.0 (Chicago, Illinois, USA) statistical program was used for all analyzes.

## RESULTS

All women were interviewed and were stratified according to the expression of hormone receptors, HER2 overexpression and Ki-67 cell proliferation index in molecular subtypes. We observed that 45 % of patients were classified as Luminal-B, 42 % as Luminal-A, 4 % as HER2 and 4 % as TN. In addition, 5 patients could not be classified according to molecular subtypes due to lack of data in medical records. Distribution of social and clinicopathological characteristics, such as number of children, marital status, ethnicity, age, among others are shown in Table 1.

To analyze the involvement of chronic stressors in the period prior to BC diagnosis, the patients reported whether any daily events would have led to an emotional change in them. Patients who did not feel comfortable talking about their emotional feelings or stressful events ( $n = 13$ ) were excluded from the analysis, thus a total of 87 patients were analyzed. It was observed that 31 % of the patients were at a LR, 55.2 % were at a MR and 13.8 % were at HR for developing disease due to the stress levels in the period prior to BC diagnosis.

Table 1: Patients' social and clinicopathological characteristics

Parameters	General BC	Luminal-A	Luminal-B	HER2	TN
	<b>Number of children</b>				
Mean (SD)	2 (2)	2 (1)	3 (2)	3 (2)	3 (1)
Median (IQR)	2 (2)	2 (2)	2 (3)	2 (2)	3 (2)
≤1	27 (27.6)	14 (35.0)	12 (26.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
2-3	52 (53.1)	23 (57.5)	21 (46.7)	3 (75.0)	3 (75.0)
≥4	19 (19.4)	3 (7.5)	12 (26.7)	1 (25.0)	1 (25.0)
Unknown	2	2	0	0	0
	<b>Marital Status [n (%)]</b>				
Single	8 (8.0)	6 (14.3)	2 (4.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
Married	56 (56.0)	25 (59.5)	26 (57.8)	1 (25.0)	1 (25.0)
Separated	10 (10.0)	4 (9.5)	4 (8.9)	1 (25.0)	1 (25.0)
Divorced	8 (8.0)	2 (4.8)	4 (8.9)	0 (0.0)	1 (25.0)
Widow	18 (18.0)	5 (11.9)	9 (20.0)	2 (50.0)	1 (25.0)
	<b>Ethnicity [n (%)]</b>				
Caucasian	82 (82.0)	34 (81.0)	38 (84.4)	3 (75.0)	2 (50.0)
Non-Caucasian	18 (18.0)	8 (19.1)	7 (15.6)	1 (25.0)	2 (50.0)
	<b>Job Occupation [n (%)]</b>				
Housewife	29 (29.0)	11 (26.2)	16 (34.1)	0 (0.0)	2 (50.0)
Rural Worker	14 (14.0)	5 (11.9)	7 (15.9)	0 (0.0)	1 (25.0)
Urban Worker	57 (57.0)	26 (61.9)	22 (50.0)	4 (100.0)	1 (25.0)
	<b>Age (years)</b>				
Mean (SD)	53 (11)	51 (11)	55 (12)	47 (6)	50 (11)
Median (IQR)	53 (18)	49 (16)	57 (16)	44 (6)	48 (17)
<40 [n(%)]	8 (8.0)	4 (9.5)	4 (8.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
40-49 [n(%)]	36 (36.0)	17 (40.5)	13 (28.9)	3 (75.0)	2 (50.0)
50-59 [n(%)]	23 (23.0)	11 (26.2)	10 (22.2)	1 (25.0)	1 (25.0)
60-69 [n(%)]	28 (28.0)	9 (21.4)	15 (33.3)	0 (0.0)	1 (25.0)
70-79 [n(%)]	3 (3.0)	1 (2.4)	2 (4.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
≥80 [n(%)]	2 (2.0)	0 (0.0)	1 (2.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
	<b>Histological Type [n (%)]</b>				
IDC	91 (100.0)	36 (100.0)	43 (100.0)	4 (100.0)	3 (100.0)
ILC	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Unknown	9	6	2	0	1
	<b>Estrogen Receptor [n (%)]</b>				
Negative	9 (9.3)	1 (2.4)	0 (0.0)	4 (100.0)	4 (100.0)
Positive	88 (90.7)	41 (97.6)	45 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Unknown	3	0	0	0	0
	<b>Progesterone Receptor [n (%)]</b>				
Negative	30 (30.9)	7 (16.7)	14 (31.1)	0 (0.0)	4 (100.0)
Positive	67 (69.1)	35 (83.3)	31 (68.9)	4 (100.0)	0 (0.0)
Unknown	3	0	0	0	0
	<b>HER2 [n (%)]</b>				
Negative	70 (74.5)	42 (100.0)	24 (54.5)	0 (0.0)	4 (100.0)
Positive	24 (25.5)	0 (0.0)	20 (45.5)	4 (100.0)	0 (0.0)
Unknown	6	0	1	0	0
	<b>Ki67 [n (%)]</b>				
Low	35 (51.5)	29 (100.0)	5 (13.9)	1 (33.3)	0 (0.0)
Moderate	27 (39.7)	0 (0.0)	25 (69.4)	2 (66.7)	0 (0.0)
High	6 (8.8)	0 (0.0)	6 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)
Unknown	32	13	9	1	4
	<b>Lymph Node Involvement [n (%)]</b>				
Negative	56 (56.0)	24 (57.1)	24 (53.3)	1 (25.0)	3 (75.0)
Positive	44 (44.0)	18 (42.9)	21 (46.7)	3 (75.0)	1 (25.0)
	<b>Metastasis [n (%)]</b>				
Negative	82 (82.8)	35 (83.3)	40 (88.9)	0 (0.0)	3 (25.0)
Positive	17 (17.2)	7 (16.7)	5 (11.1)	4 (100.0)	1 (75.0)
Unknown	1	0	0	0	0

SD: standard deviation; IQR: Interquartile range; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma

We observed that most patients (69 %) reported the death of a spouse, family member or close friend as an important fact in their emotional change before BC diagnosis. However, no statistical difference was observed between the risk groups ( $p = 0.089$ , data not shown).

The next step was to associate the groups at risk of developing diseases associated with chronic stress with the sociodemographic parameters (Table 2). There was an association between the patients' marital status and the chronic stress groups prior to diagnosis ( $p = 0.012$ ). Based on this result, women were classified according to their marital status and the medians of the final scores obtained by the Holmes and Rahe stress scale for each group were compared. It was observed that the highest levels of stress were presented by separated, divorced or widowed patients compared to married ( $p < 0.01$ ) and single ( $p = 0.037$ ) patients.

Finally, we evaluated the association between the risk groups and the clinicopathological parameters (Table 3). A lower proportion of ER positive was observed in women in the HR group when compared to the LR and MR groups. A binary logistic regression analysis was performed using the ER as a dependent variable and the histological types, lymph nodes involvement and the HR group as independent variables (Table 4). The relationship between the ER and the HR of chronic stress (Holmes and Rahe  $\geq 300$ ) was independent of the histological type and lymph nodes involvement. Marital status was not included due to high collinearity with HR of chronic stress on this scale used.

## DISCUSSION

In the present study, it was observed an association between patients' marital status and risk groups for developing diseases based on stress levels, with the highest stress levels presented by the separated, divorced or widowed patients compared to married and single patients. Furthermore, women in the HR group had a lower proportion of positivity for ER when compared to the LR and MR groups. There are no data prior to this study in the literature demonstrating the association of stress levels with clinicopathological parameters of BC.

Marital status influences quality of life, a fact that was demonstrated in a study in which elderly people who were married or living in a stable union had better psychological quality of life compared to widowed, single, divorced elderly people (Roncon et al., 2015). The involvement of marital status with the risk of developing BC has been reported in several studies in the literature. A prospective study by Lillberg et al. (2003) demonstrated a two-fold increase in the risk of developing BC in a group of Finnish women after divorce and separation process. A similar result was observed by a case-control study of Li et al. (2016), in which Chinese women with marital status considered disharmonious are 1.16 times more likely to develop BC. However, other studies demonstrate the protective factor of marital status (married, separated, divorced and widows) in relation to the development of BC (Ewertz, 1986; Kvikstad et al., 1994; Lillberg et al., 2003).

**Table 2:** Association analysis between groups of risk of disease development associated with chronic stress levels and social parameters

Social Parameters		Holmes and Rahe Stress Scale			p-value
		Low Risk (<150)	Medium Risk (150-299)	High Risk ( $\geq 300$ )	
<b>Ethnicity</b> (n= 87)	Caucasian	22	39	10	1.000
	Non-Caucasian	5	9	2	
<b>Marital Status</b> (n= 87)	Single	2	4	0	0.012*
	Married	20	26	2	
	Separated/ Divorced	3	9	5	
	Widow	2	9	5	
<b>Number of Children</b> (n= 80)	$\leq 1$	4	12	2	0.779
	2-3	16	25	5	
	$\geq 4$	4	9	3	
<b>Job Occupation</b> (n= 86)	Housewife	10	13	2	0.790
	Rural Worker	3	8	1	
	Urban Worker	14	27	8	

Fisher's exact test with Monte Carlo correction. \* $p < 0.05$

**Table 3:** Analysis of the association between groups of risk of disease development associated with chronic stress levels with clinicopathological parameters inpatients

		Holmes and Rahe Stress Scale						p-value
		Low Risk (<150)		Medium Risk (150-299)		High Risk (≥150)		
		Mean / n (%)	± SD	Mean / n (%)	± SD	Mean / n (%)	± SD	
<b>Age</b>		55.4	9.0	58.7	11.0	58.2	12.7	0.431†
<b>Age at diagnosis</b>		49.7	10.9	54.5	10.9	55.2	13.0	0.192†
<b>Histological Type</b>	IDC (n=79)	27 (96.4)		43 (91.5)		9 (75.0)		0.096‡
	ILC (n=8)	1 (3.6)		4 (8.5)		3 (25.0)		
<b>PR</b>	Positive (n=58)	22 (78.6)		29 (67.4)		7 (63.6)		0.516‡
	Negative (n=24)	6 (21.4)		14 (32.6)		4 (36.4)		
<b>ER</b>	Positive (n=78)	28 (100.0)		42 (97.7)		8 (72.7)		0.001‡
	Negative (n=4)	0 (0.0)		1 (2.3)		3 (27.3)		
<b>HER2</b>	Positive (n=18)	10 (37.0)		9 (20.5)		1 (8.3)		0.110‡
	Negative (n=63)	17 (63.0)		35 (79.5)		11 (91.7)		
<b>KI-67</b>	High (n=5)	1 (8.3)		4 (10.8)		0 (0.0)		0.715‡
	Moderate (n=21)	3 (25.0)		14 (37.8)		4 (36.4)		
	Low (n=34)	8 (66.7)		19 (51.4)		7 (63.6)		
<b>Molecular Subtype</b>	Luminal-A (n=39)	12 (44.4)		20 (44.4)		7 (58.3)		0.899‡
	Luminal-B (n=37)	13 (48.2)		20 (44.4)		4 (33.3)		
	Triple Negative (n=4)	1 (3.7)		3 (6.7)		0 (0.0)		
	HER2 Overexpressed (n=4)	1 (3.7)		2 (4.5)		1 (8.4)		
<b>Lymph Node Involvement</b>	Positive (n=30)	10 (35.7)		27 (56.2)		3 (25.0)		0.069‡
	Negative (n=48)	18 (64.3)		21 (43.8)		9 (75.0)		
<b>Metastasis</b>	Positive (n=16)	4 (14.3)		10 (21.3)		2 (16.7)		0.741‡
	Negative (n=71)	24 (85.7)		37 (78.7)		10 (83.3)		

† Kruskal-Wallis test; ‡ Chi-square test. IDC: invasive ductal carcinoma. CLI: invasive lobular carcinoma

**Table 4:** Binary logistic regression analysis by the backward method using the estrogen receptor as dependent variable

Model 1	B	Wald	df	p-value	OR	95% confidence interval for Wald statistics	
						Lower Value	Higher Value
Histological Type	-0.17	0.01	1	0.905	0.843	0.051	13.819
Lymph Node Involvement	-0.03	0.72	1	0.396	0.357	0.033	3.850
Homes Rate $\geq 300$	3.48	6.79	1	0.009*	32.700	2.375	450.265
Constant	-3.64	4.64	1	0.031*	0.026		
Model 2	B	Wald	df	p-value	OR	95% confidence interval for Wald statistics	
						Lower Value	Higher Value
Lymph Node Involvement	-1.03	0.73	1	0.391	0.35	0.033	3.796
Homes Rate $\geq 300$	3.52	7.44	1	0.006*	34.07	2.702	429.864
Constant	-3.79	12.53	1	0.000*	0.022		
Model 3	B	Wald	df	p-value	OR	95% confidence interval for Wald statistics	
						Lower Value	Higher Value
Homes Rate $\geq 300$	3.25	7.18	1	0.007*	25.87	2.398	279.189
Constant	-4.23	17.67	1	0.000*	0.014		

**Model 1:** Nagelkerke R Square 0.332, **Model 2:** Nagelkerke R Square 0.332 and **Model 3:** Nagelkerke R Square 0.306. DF: degree of freedom. OR: Odds Ratio; \*p<0.05

An interesting association has been demonstrated by Schoemaker et al. (2016), in a cohort of 113,000 UK women, where the risk of developing BC with ER negativity was higher in women after divorce or separation. The authors pointed out that the association was restricted to premenopausal women, consistent with literature data showing that these women are more likely to develop ER negative breast tumors compared to postmenopausal women. Although the sample number in our study is lower, we demonstrated an association between women who had low levels of stress according to the Holmes and Rahe Stress Scale (classified in the LR group) and ER positivity. Since the highest scores on the scale are given to major events in the separation or divorce process, we can conclude that most women who made up this group were single and married.

Of the patients analyzed in our study, 55.2 % had a MR and 13.8 % had HR of developing a disease based on the stress levels, according to the scale used. In a study by Barbosa

and dos Santos (2012), using another instrument to detect stress levels (Lipp Adult Stress Symptom Inventory), it was observed that 60 % of BC patients were diagnosed with stress. Of these patients, 40 % were in the resistance, 15 % in the near-exhaustion and 5 % in the exhaustion phase.

From our patients', we observed that most (69 %) of them described death of a spouse or close family member (mother, father, child, among others) as a stressful event within a variable time of 1 year before the BC diagnosis. BC studies have demonstrated the importance of this event in cancer patients. The risk of developing BC was higher in women who described the death of their husband, family member or close friend as a stressful event in their life (Kruk, 2012; Lillberg et al., 2003).

The relationship between stress and the immune system has been discussed in the literature. Several studies have linked chronic stress to a weakened immune system (Barbosa and dos Santos, 2012). Stress has been associated with suppression of immune function and there

is evidence that it may promote the initiation of some cancers, especially those associated with DNA viruses, retroviral insertion near an oncogene, and other viruses (Reiche et al., 2004). In this context BC has been associated with several viral infections, such as human papillomavirus (HPV), Epstein–Barr virus (EBV) and more recently the human breast tumor virus (MMTV-like) (Amarante and Watanabe, 2009; de Sousa Pereira et al., 2020). Prolonged unemployment, depression and bereavement are stressors that seem to produce a diminished immune response, with cases of prolonged immunosuppression. More than two decades ago, O'Leary (1990) reviewed empirical evidence linking emotional processes to immune function in humans.

## CONCLUSION

In this study, we can verify the association between chronic life stressors prior to BC diagnosis with marital status and positivity for ER, demonstrating the social and clinicopathological panorama of BC patients attended at the LCH, Paraná, Brazil. Despite being considered an important factor in the development and progression of cancer, the relationship between stressful life experiences and BC is not well established. Therefore, our research collaborates with the literature in an attempt to confirm the importance of stress as a factor associated with BC development.

### *Acknowledgment*

The authors would like to thank all the volunteers who made this study possible. This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação Araucária do Paraná, Extension Program “University Without Borders”, of the Secretary of State for Science, Technology and Higher Education and Pró-Reitoria de Extensão from Londrina State University.

### *Conflict of interest*

The authors report no conflict of interest related to this research.

## REFERENCES

- Amarante MK, Watanabe MA. The possible involvement of virus in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135:329-37. doi: 10.1007/s00432-008-0511-2.
- Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin North Am*. 2014;23:409-22. doi: 10.1016/j.soc.2014.03.011.
- Barbosa MR, dos Santos FU. Fontes estressoras no paciente com diagnóstico de neoplasia mamária maligna. *Rev Brasil Terap Cogn*. 2012;8(1):10-8.
- Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;165:193-200. doi: 10.1007/s10549-017-4325-2.
- Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *FEMINA*. 2011;39(10):499-503.
- Cormanique TF, Almeida LEDFd, Rech CA, Rech D, Herrera ACdSdA, Panis C. Chronic psychological stress and its impact on the development of aggressive breast cancer. *Einstein (São Paulo)*. 2015;13:352-6.
- de Sousa Pereira N, Akelinghton Freire Vitiello G, Karina Banin-Hirata B, Scantamburlo Alves Fernandes G, José Sparça Salles M, Karine Amarante M, et al. Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-like env sequence in Brazilian breast cancer samples: implications in clinicopathological parameters in molecular subtypes. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17 (24):9496.
- Dourado CdS, Souza CBd, Castro DSd, Zandonade E, Miotto MHMdB, Amorim MHC. Associação entre eventos de vida pós diagnóstico de câncer de mama e metástase. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2018;23:471-80.
- Ewertz M. Bereavement and breast cancer. *Br J Cancer*. 1986;53:701-3. doi: 10.1038/bjc.1986.117.
- Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*. 2007;10:109-20. doi: 10.1080/10253890701288935.
- Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, 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). *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(7):e48-72.
- Holmes TH, Rahe RH. The social readjustment rating scale. *J Psychosom Res*. 1967;11:213-8. doi: 10.1016/0022-3999(67)90010-4.
- Horn J, Åsvold BO, Opdahl S, Tretli S, Vatten LJ. Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:237-43. doi: 10.1007/s10549-013-2531-0.

- INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde, 2017.
- INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde, 2019.
- Jung S, Wang M, Anderson K, Baglietto L, Bergkvist L, Bernstein L, et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *Int J Epidemiol.* 2016;45:916-28. doi: 10.1093/ije/dyv156.
- Kruk J. Self-reported psychological stress and the risk of breast cancer: A case-control study. *Stress.* 2012;15:162-71. doi: 10.3109/10253890.2011.606340.
- Kvikstad A, Vatten LJ, Tretli S, Kvinnsland S. Death of a husband or marital divorce related to risk of breast cancer in middle-aged women. A nested case-control study among Norwegian women born 1935-1954. *Eur J Cancer.* 1994;30:473-7. doi: 10.1016/0959-8049(94)90422-7.
- Li P, Huang J, Wu H, Fu C, Li Y, Qiu J. Impact of lifestyle and psychological stress on the development of early onset breast cancer. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(50):e5529-e. doi: 10.1097/MD.0000000000005529.
- Lillberg K, Verkasalo PK, Kaprio J, Teppo L, Helenius H, Koskenvuo M. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2003;157:415-23. doi: 10.1093/aje/kwg002.
- Makarem N, Chandran U, Bandera EV, Parekh N. Dietary fat in breast cancer survival. *Annu Rev Nutr.* 2013;33:319-48. doi: 10.1146/annurev-nutr-112912-095300.
- McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med.* 1998;338:171-9. doi: 10.1056/nejm199801153380307.
- McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res.* 2000;886:172-89. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4.
- McEwen BS, Gianaros PJ. Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1186:190-222. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05331.x.
- O'Leary A. Stress, emotion, and human immune function. *Psychol Bull.* 1990;108:363-82. doi: 10.1037/0033-2909.108.3.363.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52. doi: 10.1038/35021093.
- Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol.* 2004;5:617-25. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01597-9.
- Roncon J, Lima S, Pereira MG. Qualidade de vida, morbidade psicológica e stress familiar em idosos residentes na comunidade. *Psicologia: Teoria e Pesquisa.* 2015;31(1):87-96.
- Santos MCL, Horta BL, Amaral JF, Fernandes PFCBC, Galvão CM, Fernandes AFC. Association between stress and breast cancer in women: a meta-analysis. *Cadernos de Saúde Pública.* 2009;25:S453-S63.
- Schoemaker MJ, Jones ME, Wright LB, Griffin J, McFadden E, Ashworth A, et al. Psychological stress, adverse life events and breast cancer incidence: a cohort investigation in 106,000 women in the United Kingdom. *Breast Cancer Res.* 2016;18(1):72. doi: 10.1186/s13058-016-0733-1.
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21387.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98: 10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098.
- Sterling P, Eyer J. Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J (eds): *Handbook of life stress, cognition and health* (pp 629-49). Oxford, UK: Wiley, 1988.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
- Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, 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. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3997-4013. PubMed PMID: 24101045.

## 3.2 ARTIGO 2 – “DELETION OF THE *APOBEC3B* AND DETECTION OF MMTV-LIKE DNA IN BRAZILIAN BREAST CANCER PATIENTS”

### ABSTRACT

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. Viral infections contribute to at least 12% of all types of human tumors. It is well known that some viruses are associated with human tumors and the hypothesis that a retrovirus homologous to MMTV is involved in the development of human BC has fascinated scientists for years. The interest in this hypothesis was renewed when the complete gene sequence of the provirus in human BC tissue samples was identified, with this sequence being 95% homologous to the MMTV sequence, receiving the name of mouse mammary tumor virus like (MMTV-like). An interesting source of genomic instability through DNA mutations are the cytidine deaminase enzymes belonging to the apolipoprotein B mRNA editing enzyme family, similar to catalytic polypeptide 3 (*APOBEC3*), which are activated in a cellular response against an infection. These enzymes are capable of generating point mutations in the host cell genome, making it possible for malignant transformation. Because they are important in controlling viral infections and induced by IFN signaling in antiviral immune responses, it is plausible that viruses are involved in this process. *APOBEC3A* and *APOBEC3B* cytidine deaminases have been implicated in the pathogenesis of multiple cancers. A germline deletion linking *APOBEC3A* and *APOBEC3B* loci (*APOBEC A3A/B*) has been associated with higher *APOBEC*-mediated mutational burden. Thus, in the present study we aimed to evaluate the association of *APOBEC A3A/B* genotypes with the detection of the MMTV-like *env* gene in BC patients. Clinicopathological features were retrieved from medical records from patients. Tumor tissue and blood samples were collected from 209 women during mastectomy section. MMTV-like *env* sequence was evaluated through nested-PCR and *APOBEC A3A/B* genotypes through allele-specific PCR. Considering the MMTV-like negative samples, WT/Del genotype is negatively correlated with tumor stage (Tau-b = -0.151;  $p = 0.044$ ). In MMTV-like positive, WT/Del genotype is negatively correlated with age at diagnosis (Tau-c = -0.382;  $p = 0.009$ ) and positively correlated with expression of the estrogen receptor (Tau-b = 0.179;  $p = 0.041$ ). Although *APOBEC A3A/B* genotypes are not associated with MMTV-like DNA in the tumor microenvironment of Brazilian patients diagnosed with BC, the genotypes are correlated with clinicopathological parameters of patients with and without the MMTV-like *env* gene.

**Keywords:** breast carcinoma; genetic polymorphism; clinicopathological parameters; *APOBEC*.

### 1. 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 estimated global incidence of BC was 2.3 million new cases in 2020. BC is also the

fifth cause of death from this cancer worldwide, accounting for 685 thousand deaths in 2020 (Sung, Ferlay et al. 2021).

Viral infections contribute to at least 12% of all types of human tumors and prominent viruses causing or associated with cancer include papilloma virus (HPV), hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), Epstein-Barr virus (EBV), herpesvirus associated with Kaposi's sarcoma (KSHV), the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) and the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) (Moore and Chang 2010, Gaglia and Munger 2018). Viruses can contribute to oncogenesis in multiple ways, such as: (a) by directly encoding oncogenic proteins, (b) causing chronic inflammation and (c) by promoting genomic instability or other changes in host cells (Gaglia and Munger 2018).

The mouse mammary tumor virus (MMTV), from *Betaretroviridae* genus of the *Retroviridae* family, was initially associated with the development of BC in mice by BITTNER, J. J. (1936). The hypothesis that a retrovirus homologous to MMTV is involved in the development of human BC has fascinated scientists for years. The interest in this hypothesis was renewed when the complete gene sequence of the provirus in human BC tissue samples was identified, with this sequence being 95% homologous to the MMTV sequence, receiving the name of mouse mammary tumor virus like (MMTV-like) (Liu, Wang et al. 2001). It is possible to observe that the involvement of MMTV-like in the pathogenesis of human BC has been evidenced in the literature over the years (Amarante, de Sousa Pereira et al. 2019, Lawson and Glenn 2019). However, the possible mechanisms behind MMTV-like association with BC remain unknown.

It is known that the apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like (APOBEC) family of proteins has diverse and important functions in human health and disease. The APOBEC family in humans consists of 11 primary gene products and alternatively spliced variants that include APOBEC A1, Activation Induced Deaminase (AID), APOBEC2 (A2), APOBEC3A-H (A3A-D, A3AF-H) and APOBEC4 (A4) proteins. APOBEC3 enzymes are activated by interferons in cellular responses against infections, especially by viruses, being an interesting source of genomic instability through DNA mutations. These enzymes convert cytosines into uracils, aiming to inactivate viral genomes, but they are also capable of generating point mutations in the host cell genome as a side effect, making it possible for malignant transformation (Henderson and Fenton 2015). Previous analyses have already

shown that APOBEC3A and APOBEC3B were able to induce mutations in breast cells (Burns, Temiz et al. 2013). Assessing the mutational load of these two enzymes, recent studies have shown that APOBEC3A is a potent mutagenic agent than APOBEC3B (Chan, Roberts et al. 2015, Cortez, Brown et al. 2019).

A germline copy-number deletion polymorphism that results in the deletion of *APOBEC3B* coding gene and linking its 3' untranslated region (3'-UTR) to *APOBEC3A* coding exons (*APOBEC A3A/B*) has already been associated with a greater burden of mutational signatures consistent with APOBEC3 activity and with increase in the risk for BC (Xuan, Li et al. 2013, Nik-Zainal, Wedge et al. 2014, Han, Qi et al. 2016, Middlebrooks, Banday et al. 2016, Hashemi, Moazeni-Roodi et al. 2019), suggesting that carriers of the deleted allele had greater APOBEC activity, since the deletion generates a more stable mRNA isoform for APOBEC3A (Chan, Roberts et al. 2015).

Despite the importance of APOBEC3 family enzymes in the carcinogenesis of several tumors is well documented, little is known about the mechanisms that regulate their activity in cancer. Because they are important in controlling viral infections and are induced by interferon signaling during antiviral responses (Verhalen, Starrett et al. 2016), it is plausible that viruses are involved in this process. Thus, in the present study we aimed to evaluate the association of *APOBEC3 A3A/B* genotypes with the detection of the MMTV-like *env* gene in Brazilian BC patients.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1 Human Subjects*

The human BC samples used in the present study were characterized in previous publications (de Sousa Pereira, Akelington Freire Vitiello et al. 2020, Vitiello, de Sousa Pereira et al. 2020). This study received approval from Human Ethics Committee of Londrina State University (CAAE 73557317.0.0000.5231 and CAAE 47709015.2.0000.5231). Women diagnosed with BC were invited to participate during the clinical care in Londrina Cancer Hospital (Londrina, PR, Brazil) and signed a form of free-informed consent prior to the collection of biological material. All patients were treated by the Brazilian Public Health System (SUS).

Clinicopathological features were retrieved from patients' medical records and included: age at diagnosis, tumor size, histopathological grade, lymph node

metastasis (LNM) status, pathological disease stage and immunostaining for Ki67 (cellular proliferation index), tumor suppressor p53, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and patient's survival. Only 94 patients had enough data in their medical records to be classified into molecular BC subtypes. Immunohistochemical analysis for Ki67, ER, PR, HER2 and p53 mutation were performed as a clinical routine in the Laboratory of Clinical Pathology of the LCH, following standard protocol (Hammond, Hayes et al. 2010, Wolff, Hammond et al. 2013). Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria (Brierley, Gospodarowicz et al. 2017). BC was classified according to the number of tumor cells expressing Ki67 in low (15%), intermediate (16%–30%), or high (>30%) expression groups (Goldhirsch, Ingle et al. 2009).

### *2.3 DNA extraction and nested PCR for MMTV-like env gene and APOBEC A3A/B genotyping*

Genomic DNA was obtained from tissue and blood samples, that were collected during mastectomy surgery by the responsible surgeon, by salting-out method (Kirby 1990). DNA samples were quantified by NanoDrop-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA) at a wavelength of 260/280nm and adjusted for a concentration of 100 ng/ $\mu$ L.

As mentioned above, results from the detection of MMTV-like *env* gene and the *APOBEC A3A/B* genotyping were previously published by our study group (de Sousa Pereira, Akelington Freire Vitiello et al. 2020, Vitiello, de Sousa Pereira et al. 2020). Therefore, in this study, we used data from these two articles to assess the relationship between *APOBEC A3A/B* genotypes and the presence of MMTV-like in tumor tissue. For current analyses, crossing the results of detection of MMTV-like *env* gene and *APOBEC A3A/B* genotypes, a cohort of 209 BC patients were enrolled.

### *2.4 Statistical analyses*

The correlation analysis was performed using the Kendall's Tau-b and Tau-c coefficients. The case-control study was carried out using the chi-square test. The SPSS Statistics 20.0 program (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA) and the GraphPad Prism version 6.1 (GraphPad Software Inc. San Diego, California, USA) were used. For all data, the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTS

Median age of the patients was 55 (interquartile range: 47-66) years, with the majority having an age ranging from 40 to 49 years (26.4%). Median tumor size was 2.2 (interquartile range: 1.5-3.2) cm, with 46.9% of the sampled presenting a tumor ranging from 1.51-3.00 cm. Regarding the histological type, the vast majority were classified as invasive ductal carcinoma (90.3%). Considering the specific subtypes of BC, data from the medical records of 195 patients were available and most were classified as Luminal-A (68.7%), followed by Luminal-B (12.3%), triple negative (TN) (12.3%) and HER2 overexpressed (6.7%).

MMTV-like *env* gene was detected in tumor tissue from 19.1% (40/209) of samples. Of these, 26 were classified as Luminal-A, 6 as Luminal B, 5 as HER2 overexpressed and 1 as TN. The *APOBEC A3A/B* genotypes observed in the analyzed samples were the wild genotype (WT/WT) and the heterozygous genotype (WT/Del), no sample with the homozygous genotype (Del/Del) was found. Thus, WT/WT genotype was observed in 86.1% (180/209) of BC samples and WT/Del genotype was observed in 13.9% (29/209) patients.

Clinicopathological features according to detection of MMTV-like *env* gene and *APOBEC A3A/B* genotypes are shown in Table 1.

**Table 1** – Data on the clinicopathological characteristics of the patients.

	MMTV-like positive		MMTV-like negative	
	WT/WT	WT/Del	WT/WT	WT/Del
<b>Age (years)</b>				
Mean (SD)	60 (14)	41 (6)	56 (13)	56 (13)
Median (IQR)	57 (22)	41 (7)	53 (17)	59 (18)
<40 [n (%)]	3 (8.8)	2 (40.0)	13 (8.9)	3 (12.5)
40-49 [n (%)]	7 (20.6)	3 (60.0)	41 (28.3)	5 (20.8)
50-59 [n (%)]	8 (23.5)	0 (0.0)	36 (24.8)	4 (16.6)
60-69 [n (%)]	7 (20.6)	0 (0.0)	33 (22.7)	9 (37.5)
70-79 [n (%)]	7 (20.6)	0 (0.0)	16 (11.1)	2 (8.3)
≥80 [n (%)]	2 (5.9)	0 (0.0)	6 (4.2)	1 (4.3)
Missed [n (%)]		1		0
<b>Tumor size (cm)</b>				
Mean (SD)	2.9 (2.4)	3.7 (1.7)	2.8 (1.9)	2.6 (1.7)
Median (IQR)	2.0 (0.7)	3.5 (1.5)	2.2 (2.0)	2.4 (1.4)
0-1.5 [n (%)]	6 (17.1)	1 (20.0)	41 (28.7)	6 (25.0)
1.51-3.0 [n (%)]	21 (60.0)	1 (20.0)	62 (43.3)	14 (58.4)
>3.0 [n (%)]	8 (22.9)	3 (60.0)	40 (28.0)	4 (16.6)
Missed		1		2
<b>Histopathological grade [n (%)]</b>				
I	5 (15.1)	0 (0.0)	22 (16.1)	1 (4.8)
II	11 (33.4)	2 (40.0)	57 (41.6)	11 (52.4)
III	17 (51.5)	3 (60.0)	58 (42.3)	9 (42.8)
Missed		2		11
<b>Histological Class [n (%)]</b>				
IDC	30 (85.7)	5 (100.0)	132 (92.3)	20 (83.3)
ILC	2 (5.7)	0 (0.0)	3 (2.1)	1 (4.2)
Other	3 (8.6)	0 (0.0)	8 (5.6)	3 (12.5)
Missed		0		2
<b>Tumor stage [n (%)]</b>				
0	2 (7.7)	0 (0.0)	6 (5.3)	2 (10.0)
I	8 (30.8)	0 (0.0)	22 (19.3)	5 (25.0)
II	7 (26.9)	3 (75.0)	46 (40.4)	11 (55.0)
III	7 (26.9)	1 (25.0)	34 (29.7)	1 (5.0)
IV	2 (7.7)	0 (0.0)	6 (5.3)	1 (5.0)
Missed		10		38
<b>Lymph node metastasis [n (%)]</b>				
Positive	16 (47.1)	2 (40.0)	68 (49.3)	7 (30.4)
Negative	18 (52.9)	3 (60.0)	70 (50.7)	16 (69.6)
Missed		1		8
<b>Estrogen receptor [n (%)]</b>				
Positive	27 (79.4)	5 (100.0)	108 (78.3)	20 (86.9)
Negative	7 (20.6)	0 (0.0)	30 (21.7)	3 (13.1)
Missed		1		8
<b>Progesterone receptor [n (%)]</b>				
Positive	19 (55.9)	2 (40.0)	74 (53.6)	13 (56.5)
Negative	15 (44.1)	3 (60.0)	64 (46.4)	10 (43.5)
Missed		1		8
<b>HER2 [n (%)]</b>				
Positive	10 (30.3)	1 (20.0)	24 (17.9)	2 (8.7)
Negative	23 (69.7)	4 (80.0)	110 (82.1)	21 (91.3)
Missed		2		12

<b>Ki67 [n (%)]</b>				
Low	9 (29.0)	0 (0.0)	36 (28.8)	2 (10.5)
Intermediate	13 (42.0)	2 (50.0)	48 (38.4)	13 (68.4)
High	9 (29.0)	2 (50.0)	41 (32.8)	4 (21.1)
Missed		5		25
<b>p53 [n (%)]</b>				
Positive	11 (36.7)	3 (75.0)	45 (33.8)	5 (23.8)
Negative	19 (63.3)	1 (25.0)	88 (66.2)	16 (76.2)
Missed		6		15

SD: Standard deviation; IQR: interquartile range; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma.

The first step of this work was to investigate the association between the *APOBEC A3A/B* genotypes with the detection of MMTV-like *env* gene. As shown in Table 2, no association was found.

**Table 2** – Association analyses between *APOBEC A3A/B* genotypes and detection of MMTV-like *env* gene in BC samples

<b>Genotypes</b>	<b>MMTV-like <i>env</i></b>		<b><math>\chi^2</math> p-value</b>	<b>Odds Ratio (CI 95%)</b>
	<b>Negative</b>	<b>Positive</b>		
WT/WT [n (%)]	145 (85.8)	35 (87.5)	1.00	0.87 (0.31-2.46)
WT/Del [n (%)]	24 (14.2)	5 (12.5)		

$\chi^2$ : Chi-squared test; CI: confidence interval

Next, we sought to investigate if *APOBEC A3A/B* genotypes were correlated with prognostic clinicopathological parameters considering both MMTV-like *env* negative and positive tumor tissue samples, results are shown in Table 3.

Considering the MMTV-like negative samples, patients with WT/Del genotype had a lower tumor stage compared to patients with WT/WT genotype (Tau-b = -0.151;  $p = 0.044$ ). In MMTV-like positive, BC patients with heterozygous genotype presented lower age at diagnosis (Tau-c = -0.382;  $p = 0.009$ ) and were mostly positive for expression of the ER (Tau-b = 0.179;  $p = 0.041$ ).

**Table 3** – Correlation analyses between *APOBEC A3A/B* genotypes and clinicopathological parameters in tumor tissue samples

Parameter	MMTV-like negative	MMTV-like positive
	Tau ( $\rho$ )	Tau ( $\rho$ )
Age	0.007 (0.906)	-0.382 (0.009*)
Tumor size	-0.006 (0.918)	0.192 (0.186)
Histopathological grade	0.043 (0.534)	0.091 (0.504)
Histological class	0.109 (0.265)	-0.140 (0.068)
Tumor stage	-0.151 (0.044*)	0.097 (0.394)
Lymph node metastasis	-0.132 (0.085)	-0.047 (0.765)
Estrogen receptor	0.075 (0.276)	0.179 (0.041*)
Progesterone receptor	0.020 (0.796)	-0.107 (0.511)
HER2	-0.088 (0.182)	-0.077 (0.605)
Ki67	0.023 (0.713)	0.198 (0.160)
p53	-0.073 (0.331)	0.251 (0.173)

\* $p < 0.05$

#### 4. DISCUSSION

Presence of MMTV-like *env* gene in BC tumor tissue is variable worldwide, being found in between 0 to 74% of samples analyzed (Amarante, de Sousa Pereira et al. 2019). In Brazil, in a previous study, we observed the presence of MMTV-like *env* sequence in 18.9% of tumor tissue samples. Surprisingly, we found some correlations between the presence of MMTV-like with clinicopathological parameters considered to predict a better disease prognosis (de Sousa Pereira, Akelington Freire Vitiello et al. 2020). This led us to think about the antiviral response produced by the immune system in the tumor microenvironment, since it has already been shown an increase in the expression of genes related to the viral infection response, such as interferons (IFNs), in BC (Fernandez-Cobo, Melana et al. 2006).

The family of APOBEC3 enzymes are activated by IFNs, specifically type I IFNs, and act on viral restriction, by inducing mutations in the virus genome (Stavrou and Ross 2015). The mutagenic process promoted by these enzymes also affects the host's DNA, showing a relationship between viral infection, increased expression of APOBEC3 and the mutagenic signature of this enzyme in several types of cancer associated with viruses, such as cervical cancer and oropharynx positive for HPV (Vieira, Leonard et al. 2014) and EBV positive gastric cancer (Bobrovnitchaia, Valieris et al. 2020). The *APOBEC A3A/B* has been pointed in susceptibility to the development of BC in Asian and Caucasian populations (Klonowska, Kluzniak et al.

2017), but, in previous study from our research group, we found that there is no association between *APOBEC A3A/B* genotypes and BC susceptibility in Brazilian population (Vitiello, de Sousa Pereira et al. 2020).

In this study, we evaluated the relationship between the *APOBEC A3A/B* genotypes and the presence of MMTV-like in breast tumor tissue and no statistical association were found. So far, there is no other work present in the literature that associates these two parameters in BC patients. Other studies have shown that the loss of the *APOBEC3B* gene can increase susceptibility to viral infection, as in infections by human immunodeficiency virus (HIV), HBV and HPV (An, Johnson et al. 2009, Zhang, Cai et al. 2012, Revathidevi, Manikandan et al. 2016, Singh, Marathe et al. 2016). Interestingly, in the study from Zhang, Cai et al. (2012), in addition to the increased susceptibility to HBV infection, a greater susceptibility to the development of hepatocellular carcinoma associated with HBV was also observed. In our study, despite not showing statistical significance, we can observe that patients who were positive for MMTV-like *env* gene and WT/Del genotype had markers of worse BC prognosis.

We could observe that patients that were negative for MMTV-like DNA and with a heterozygous genotype had a lower tumor stage compared to patients with a wild genotype. Rezaei, Hashemi et al. (2015) investigated the association between *APOBEC A3A/B* genotypes and clinicopathological parameters in BC samples, including tumor stage, and no significant association was observed. Also, correlation analyzes between *APOBEC A3A/B* genotypes and clinicopathological parameters of tumor samples positive for the presence of MMTV-like *env* gene demonstrated a correlation between the heterozygous genotype with lower age at diagnosis. In agreement with our findings, Cescon, Haibe-Kains et al. (2015) found that age at diagnosis was slightly lower in BC patients that carries the deleted allele. Therefore, based on these results, we can suggest that patients with a deletion of *APOBEC3B* gene in the presence of MMTV-like in the tumor microenvironment may have greater genetic instability, as this deletion induces a greater enzymatic activity of *APOBEC3A*, which may result in early development of BC.

Also, we observed a correlation with expression of ER in MMTV-like positive tumor tissue. It has been described that the *APOBEC3B* expression is induced by estradiol in ER+ BC cell lines, suggesting that *APOBEC3B* is an estrogen-responsive gene and *APOBEC3A* is not (Udquim, Zettelmeyer et al. 2020). Also, Periyasamy,

Patel et al. (2015) showed that APOBEC3B is required for regulation of gene expression by ER and acts by causing deamination at ER binding regions. They demonstrated that APOBEC3B expression is associated with poor patient survival in ER+ BC, reinforcing the physiological significance of these enzyme for ER action.

Several studies have already demonstrated the role of APOBEC3 in the infection by MMTV in mice and in the development of BC in these animals. In a study conducted by Okeoma, Low et al. (2009) it was found that APOBEC3 reduces infection by MMTV in its natural host, by limiting infection in dendritic cells. Thus, increased levels of APOBEC3 in mice can lead to increased levels of viral restriction (Okeoma, Low et al. 2009, Okeoma, Huegel et al. 2010, MacMillan, Kohli et al. 2013). Recently, a study has showed that MMTV provirus carries a lesser number of mutations caused by the APOBEC3 enzymes compared to lentiviruses, such as HIV. Apparently, MMTV reverse transcriptase has evolved, increasing its enzymatic speed, in order to avoid the access of APOBEC3s to DNA strands exposed during reverse transcription (Hagen, Kraase et al. 2019).

In summary, this study demonstrated, for the first time, that *APOBEC A3A/B* genotypes are not associated with the presence of MMTV-like DNA in the tumor microenvironment of Brazilian patients diagnosed with BC. However, *APOBEC A3A/B* genotypes are correlated with clinicopathological parameters of patients with and without the MMTV-like *env* gene, such as tumor staging, age at diagnosis and ER expression. As the implications of MMTV-like in the development of BC have been explored worldwide, varying according to the population analyzed, and our work is limited to analyzing the *APOBEC A3A/B* genotypes, other studies must be carried out to evaluate the participation of viral restriction caused by enzymes of the APOBEC3 family in MMTV-like in patients with human breast carcinoma.

### **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).

**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

- 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.
- An, P., R. Johnson, J. Phair, G. D. Kirk, X.-F. Yu, S. Donfield, S. Buchbinder, J. J. Goedert and C. A. Winkler (2009). "APOBEC3B deletion and risk of HIV-1 acquisition." The Journal of infectious diseases **200**(7): 1054-1058.
- Bobrovnitshaia, I., R. Valieris, R. D. Drummond, J. P. Lima, H. C. Freitas, T. F. Bartelli, M. G. de Amorim, D. N. Nunes, E. Dias-Neto and I. T. da Silva (2020). "APOBEC-mediated DNA alterations: A possible new mechanism of carcinogenesis in EBV-positive gastric cancer." **146**(1): 181-191.
- Brierley, J., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). TNM Classification of Malignant Tumours. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.
- Burns, M. B., N. A. Temiz and R. S. Harris (2013). "Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers." Nature Genetics **45**(9): 977-983.
- Cescon, D. W., B. Haibe-Kains and T. W. Mak (2015). "APOBEC3B expression in breast cancer reflects cellular proliferation, while a deletion polymorphism is associated with immune activation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**(9): 2841-2846.
- Chan, K., S. A. Roberts, L. J. Klimczak, J. F. Sterling, N. Saini, E. P. Malc, J. Kim, D. J. Kwiatkowski, D. C. Fargo, P. A. Mieczkowski, G. Getz and D. A. Gordenin (2015). "An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers." Nature Genetics **47**(9): 1067-1072.
- Cortez, L. M., A. L. Brown, M. A. Dennis, C. D. Collins, A. J. Brown, D. Mitchell, T. M. Mertz and S. A. Roberts (2019). "APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer." PLOS Genetics **15**(12): e1008545.
- de Sousa Pereira, N., G. Akelinghton Freire Vitiello, B. Karina Banin-Hirata, G. Scantamburlo Alves Fernandes, M. José Sparça Salles, M. Karine Amarante and M. Angelica Ehara Watanabe (2020). "Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-Like env Sequence in Brazilian Breast Cancer Samples: Implications in Clinicopathological Parameters in Molecular Subtypes." International Journal of Environmental Research and Public Health **17**(24): 9496.
- 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.
- Gaglia, M. M. and K. Munger (2018). "More than just oncogenes: mechanisms of tumorigenesis by human viruses." Curr Opin Virol **32**: 48-59.
- Goldhirsch, A., J. N. Ingle, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann and H. J. Senn (2009). "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009." Ann Oncol **20**(8): 1319-1329.
- Hagen, B., M. Kraase, I. Indikova and S. Indik (2019). "A high rate of polymerization

during synthesis of mouse mammary tumor virus DNA alleviates hypermutation by APOBEC3 proteins." *PLOS Pathogens* **15**(2): e1007533.

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.

Han, Y., Q. Qi, Q. He, M. Sun, S. Wang, G. Zhou and Y. Sun (2016). "APOBEC3 deletion increases the risk of breast cancer: a meta-analysis." *Oncotarget* **7**(46): 74979-74986.

Hashemi, M., A. Moazeni-Roodi and M. Taheri (2019). "Association of APOBEC3 deletion with cancer risk: A meta-analysis of 26 225 cases and 37 201 controls." *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* **15**(6): 275-287.

Henderson, S. and T. Fenton (2015). "APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer drivers." *Trends Mol Med* **21**(5): 274-284.

Kirby, L. T. (1990). *DNA Fingerprint*. Londres, Palgrave Macmillan UK.

Klonowska, K., W. Kluzniak, B. Rusak, A. Jakubowska, M. Ratajska, N. Krawczynska, D. Vasilevska, K. Czubak, M. Wojciechowska, C. Cybulski, J. Lubinski and P. Kozlowski (2017). "The 30 kb deletion in the APOBEC3 cluster decreases APOBEC3A and APOBEC3B expression and creates a transcriptionally active hybrid gene but does not associate with breast cancer in the European population." *Oncotarget* **8**(44).

Lawson, J. S. and W. K. Glenn (2019). "Evidence for a causal role by mouse mammary tumour-like virus in human breast cancer." *npj Breast Cancer* **5**(1): 40.

Liu, B., Y. Wang, S. M. Melana, I. Pelisson, V. Najfeld, J. F. Holland and B. G. Pogo (2001). "Identification of a proviral structure in human breast cancer." *Cancer Res* **61**(4): 1754-1759.

MacMillan, A. L., R. M. Kohli and S. R. Ross (2013). "APOBEC3 inhibition of mouse mammary tumor virus infection: the role of cytidine deamination versus inhibition of reverse transcription." *J Virol* **87**(9): 4808-4817.

Middlebrooks, C. D., A. R. Banday, K. Matsuda, K.-I. Udquim, O. O. Onabajo, A. Paquin, J. D. Figueroa, B. Zhu, S. Koutros, M. Kubo, T. Shuin, N. D. Freedman, M. Kogevinas, N. Malats, S. J. Chanock, M. Garcia-Closas, D. T. Silverman, N. Rothman and L. Prokunina-Olsson (2016). "Association of germline variants in the APOBEC3 region with cancer risk and enrichment with APOBEC-signature mutations in tumors." *Nature genetics* **48**(11): 1330-1338.

Moore, P. S. and Y. Chang (2010). "Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology." *Nat Rev Cancer* **10**(12): 878-889.

Nik-Zainal, S., D. C. Wedge, L. B. Alexandrov, M. Petljak, A. P. Butler, N. Bolli, H. R. Davies, S. Knappskog, S. Martin, E. Papaemmanuil, M. Ramakrishna, A. Shlien, I. Simoncic, Y. Xue, C. Tyler-Smith, P. J. Campbell and M. R. Stratton (2014). "Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer." *Nature Genetics* **46**(5): 487-491.

Okeoma, C. M., A. L. Huegel, J. Lingappa, M. D. Feldman and S. R. Ross (2010). "APOBEC3 proteins expressed in mammary epithelial cells are packaged into

retroviruses and can restrict transmission of milk-borne virions." Cell Host Microbe **8**(6): 534-543.

Okeoma, C. M., A. Low, W. Bailis, H. Y. Fan, B. M. Peterlin and S. R. Ross (2009). "Induction of APOBEC3 in vivo causes increased restriction of retrovirus infection." J Virol **83**(8): 3486-3495.

Periyasamy, M., H. Patel, C.-F. Lai, Van T. M. Nguyen, E. Nevedomskaya, A. Harrod, R. Russell, J. Remenyi, Anna M. Ochocka, Ross S. Thomas, F. Fuller-Pace, B. Györfy, C. Caldas, N. Navaratnam, Jason S. Carroll, W. Zwart, R. C. Coombes, L. Magnani, L. Buluwela and S. Ali (2015). "APOBEC3B-Mediated Cytidine Deamination Is Required for Estrogen Receptor Action in Breast Cancer." Cell Reports **13**(1): 108-121.

Revathidevi, S., M. Manikandan, A. K. D. M. Rao, V. Vinothkumar, G. Arunkumar, K. S. Rajkumar, R. Ramani, R. Rajaraman, C. Ajay and A. K. Munirajan (2016). "Analysis of APOBEC3A/3B germline deletion polymorphism in breast, cervical and oral cancers from South India and its impact on miRNA regulation." Tumor Biology **37**(9): 11983-11990.

Rezaei, M., M. Hashemi, S. M. Hashemi, M. A. Mashhadi and M. Taheri (2015). "APOBEC3 Deletion is Associated with Breast Cancer Risk in a Sample of Southeast Iranian Population." International journal of molecular and cellular medicine **4**(2): 103-108.

Singh, H., S. D. Marathe, S. Nain, V. Nema, M. V. Ghate and R. R. Gangakhedkar (2016). "APOBEC3B deletion impacts on susceptibility to acquire HIV-1 and its advancement among individuals in western India." Apmis **124**(10): 881-887.

Stavrou, S. and S. R. Ross (2015). "APOBEC3 Proteins in Viral Immunity." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **195**(10): 4565-4570.

Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. Bray (2021). "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin.

Udquim, K.-I., C. Zettelmeyer, A. R. Banday, S. H.-Y. Lin and L. Prokunina-Olsson (2020). "APOBEC3B expression in breast cancer cell lines and tumors depends on the estrogen receptor status." Carcinogenesis **41**(8): 1030-1037.

Verhalen, B., G. J. Starrett, R. S. Harris and M. Jiang (2016). "Functional Upregulation of the DNA Cytosine Deaminase APOBEC3B by Polyomaviruses." J Virol **90**(14): 6379-6386.

Vieira, V. C., B. Leonard, E. A. White, G. J. Starrett, N. A. Temiz, L. D. Lorenz, D. Lee, M. A. Soares, P. F. Lambert, P. M. Howley and R. S. Harris (2014). "Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B." mBio **5**(6).

Vitiello, G. A. F., N. de Sousa Pereira, M. K. Amarante, B. K. Banin-Hirata, C. Z. Campos, K. B. de Oliveira, R. Losi-Guembarovski and M. A. E. Watanabe (2020). "Germline APOBEC3B deletion influences clinicopathological parameters in luminal-A breast cancer: evidences from a southern Brazilian cohort." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology.

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.

Xuan, D., G. Li, Q. Cai, S. Deming-Halverson, M. J. Shrubsole, X. O. Shu, M. C. Kelley, W. Zheng and J. Long (2013). "APOBEC3 deletion polymorphism is associated with breast cancer risk among women of European ancestry." Carcinogenesis **34**(10): 2240-2243.

Zhang, T., J. Cai, J. Chang, D. Yu, C. Wu, T. Yan, K. Zhai, X. Bi, H. Zhao, J. Xu, W. Tan, C. Qu and D. Lin (2012). "Evidence of associations of APOBEC3B gene deletion with susceptibility to persistent HBV infection and hepatocellular carcinoma." Human Molecular Genetics **22**(6): 1262-1269.

### 3.3 ARTIGO 3 – “INTERFERON-GAMMA PLASMA LEVELS AND PRESENCE OF MOUSE MAMMARY TUMOR VIRUS-LIKE ENV GENE: IMPLICATIONS ON THE PATHOGENESIS OF BREAST CANCER”

#### **ABSTRACT**

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a retrovirus that has been associated with the development of breast cancer (BC) in mice. Several cytokines may be involved in the interactions between MMTV and the immune system, such as interferons (IFN). IFN- $\gamma$  can enhance Th1-mediated antitumor immune response but it can also play a protumorigenic role by transmitting antiapoptotic and proliferative signals. The identification of a 95% homologous gene sequence to MMTV in human BC samples has increased interest in this hypothesis. This virus in humans was named mouse mammary tumor virus like (MMTV-like). Little is known about the antiviral immune response in a microenvironment with the presence of MMTV-like in BC patients. Therefore, the purpose of the present study was to quantify the plasma levels of IFN- $\gamma$  in the peripheral blood of 123 neoplasia-free donors and 98 breast cancer patients of different molecular subtypes, by ELISA, and evaluate the association of these plasma levels with the detection of the MMTV-like *env* gene in tumor tissue. Correlation analyzes involving IFN- $\gamma$  plasma levels and clinical-pathological parameters were performed by Kendall Tau-c test. In our study, a decrease in IFN- $\gamma$  levels was observed in the group of BC patients ( $30.85 \pm 57.49\text{pg/ml}$ ) compared to the control group ( $115.00 \pm 176.80\text{pg/ml}$ ) ( $p < 0.0001$ ). In the analysis by stratified BC molecular subtypes, Luminal-A ( $30.79 \pm 61.04\text{pg/ml}$ ;  $p < 0.0001$ ), Luminal-B ( $24.74 \pm 25.78\text{pg/ml}$ ;  $p = 0.0188$ ) and triple-negative ( $23.95 \pm 40.45\text{pg/ml}$ ;  $p = 0.0005$ ) had a lower plasma level compared to control group. There was no significant difference between IFN- $\gamma$  plasma levels of MMTV-like DNA positive samples compared to MMTV-negative samples ( $p = 0.2056$ ). A positive correlation was observed between IFN- $\gamma$  plasma levels and tumor size (Tau-c = 0.202;  $p = 0.019$ ). By analyzing the MMTV-like *env* negative samples, we could identify that IFN- $\gamma$  plasma levels are also positively correlated with tumor size (Tau-c = 0.222;  $p = 0.020$ ) and with lymph node metastasis (Tau-c = 0.258;  $p = 0.042$ ). Another positive correlation was observed between plasma levels of this cytokine and histopathological grade (Tau-c = 0.384;  $p = 0.019$ ) in MMTV-like *env* positive samples. For the first time, we assessed the association between plasma levels of IFN- $\gamma$  and the presence of the MMTV-like *env* gene in BC samples. However, more studies are needed to clarify whether the high levels of IFN- $\gamma$  in MMTV-like *env* positive samples are reflecting a possible antiviral immune response or whether this cytokine is promoting tumor growth.

**Keywords:** breast carcinoma; cytokine; antiviral; tumor microenvironment.

#### **INTRODUCTION**

Mouse mammary tumor virus (MMTV) is a retrovirus that has been associated with the development of breast cancer (BC) in these animals (Bittner 1936). One of

the ways in which MMTV is transmitted is through breast milk containing viral particles, which initially infects lymphocytes in the neonatal Peyer's patches. The effectiveness of MMTV infection depends on the participation of a superantigen (SAg), which is encoded by its genetic material. MMTV encodes the SAg, that is presented on the cell surface through the class II MHC molecule, activating T cells. These T lymphocytes proliferate, activating B cells that produce cytokines. These cytokines stimulate and recruit dendritic cells, additional B and T lymphocytes, thus establishing a reservoir of infected cells (Ross 2008, Ross 2010).

Several cytokines may be involved in the interactions between MMTV and the immune system, such as interferons (IFN). IFN are proteins with immunomodulatory, cytostatic and cytotoxic activity, considered important to establish an antiviral response. Involved in both the innate and adaptive immune responses, they also participate and modulate the host's immune response to tumors (Seliger, Ruiz-Cabello et al. 2008). The initial response to viral infections consists of inducing high levels of type I IFNs, IFN- $\alpha$  and - $\beta$ . After this first phase, a second wave of cytokines is produced and secreted, including IFN- $\gamma$ . The main sources of IFN- $\gamma$  are the NK cells and T lymphocytes. IFN- $\gamma$  can enhance Th1-mediated antitumor immune response but it can also play a protumorigenic role by transmitting antiapoptotic and proliferative signals, resulting in immune-escape of tumor cells (Castro, Cardoso et al. 2018).

Since the association of MMTV with the development of BC in mice, there is much questioning about the involvement of a homologous virus in the development of BC in humans. The identification of a 95% homologous gene sequence to MMTV in human BC samples has increased interest in this hypothesis. The virus in humans was named mouse mammary tumor virus like (MMTV-like) (Liu, Wang et al. 2001). MMTV-like participation in the pathogenesis of human BC has been evidenced in the literature over the years (Amarante, de Sousa Pereira et al. 2019, Lawson and Glenn 2019). Little is known about the antiviral immune response in a microenvironment with the presence of MMTV-like in BC patients. The studies on the assessment of cytokine profile in individuals positive for the MMTV-like *env* gene are scarce in the literature. Therefore, in the present study we aimed to assess plasma levels of IFN- $\gamma$  in BC patients and evaluate the association of these plasma levels with the detection of MMTV-like *env* gene in BC patients.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Selection and characterization of samples*

This study was approved by the Ethics Committee of the State University of Londrina (CAAE 73557317.0.0000.5231 and CAAE 47709015.2.0000.5231). Patients were invited to participate in this research project during clinical care at the Londrina Cancer Hospital (LCH) (Londrina, PR, Brazil). The samples in the control group came from women at the Clinics Hospital of Londrina State University. As inclusion criteria in the control group, donors with no history of current or previous BC were selected, according to clinical examination and updated mammograms for the time of collection, no history of BC in the family and no infections or autoimmune diseases at the time of sample collection. As a matching parameter, the control samples were also collected in the same geographic region as the BC patients and both groups signed free informed consent form.

For current analyses, a cohort of 123 peripheral blood samples from healthy, cancer-free donors and 98 BC patients were enrolled. Clinicopathological features were retrieved from patients' medical records and included: age at diagnosis, tumor size, histopathological grade, lymph node metastasis (LNM) status, pathological disease stage and immunostaining for Ki67 (cellular proliferation index), tumor suppressor p53, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and patient's survival. Only 94 patients had enough data in their medical records to be classified into molecular BC subtypes. Immunohistochemical analysis for Ki67, ER, PR, HER2 and p53 mutation were performed as a clinical routine in the Laboratory of Clinical Pathology of the LCH, following standard protocol (Hammond, Hayes et al. 2010, Wolff, Hammond et al. 2013). Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria (Brierley, Gospodarowicz et al. 2017). BC was classified according to the number of tumor cells expressing Ki67 in low (15%), intermediate (16%–30%), or high (>30%) expression groups (Goldhirsch, Ingle et al. 2009).

### *Sample processing*

Peripheral blood was collected in an ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tube and centrifuged to collect the plasma, which was stored at -80 °C for

immunoenzymatic assays. Genomic DNA was obtained from tumor tissue and blood samples under aseptic conditions 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 100ng/ $\mu$ L.

#### *Quantification of plasma IFN- $\gamma$ levels*

Quantitative analysis of plasma IFN- $\gamma$  levels was performed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the BD OptEIA™ Human IFN- $\gamma$  ELISA Set kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), according to manufacturer conditions. To perform this quantitative analysis, a standard curve for each assay was drawn up using the serially diluted protein standard. The results of the samples were expressed in pg/ml for IFN- $\gamma$ , and the reading was carried out at 450nm in an ELISA reader Bio-Tek ELS 800 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) within 30 minutes of the addition of the stop solution. Each plasma sample was read and executed in duplicate, and samples showing a high coefficient of variation (CV>25%) between the duplicates were disregarded.

#### *Nested PCR for MMTV-like env gene*

Conditions for the amplification of the MMTV-like *env* gene were described in a previous work by our research group (de Sousa Pereira, Akelinghton Freire Vitiello et al. 2020). Therefore, in this study, we used data from this article to assess the relationship between IFN- $\gamma$  plasma levels and the presence of MMTV-like in tumor tissue.

#### *Statistical analysis*

Comparison of IFN- $\gamma$  levels between the control and BC group was performed using the non-parametric Mann-Whitney test, and the comparison between BC molecular subtypes was made using the Kruskal-Wallis test using the software GraphPad Prism (Version 6.01). Correlation analyses involving plasma IFN- $\gamma$  levels and clinicopathological parameters were performed by Kendall's Tau-c test by the SPSS Statistics 20.0 program (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA). For all analyses, the significance level adopted was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

For current analyses, 22 positive patients and 77 negative patients from our previous study were selected (de Sousa Pereira, Akelington Freire Vitiello et al. 2020). Considering the molecular subtypes of the positive samples for the presence of the MMTV-like *env* gene, we observed that 15 were classified as Luminal-A, 3 as Luminal B and 2 as HER2 overexpressed. Only 1 sample was classified as triple-negative (TN) and was not considered for the analyses.

Clinicopathological features according to BC subtypes are shown in Table 1.

**Table 1 – Data on the clinicopathological characteristics of the patients.**

Parameter	Breast cancer subgroups				
	Total (n = 98)	Luminal-A (n = 63)	Luminal-B (n = 10)	HER2 (n = 6)	TN (n = 15)
<b>Age (years)</b>					
Mean (SD)	54 (13)	55 (14)	50 (8)	48 (10)	53 (15)
Median (IQR)	53 (19)	55 (20)	49 (12)	50 (17)	51 (24)
<40 [n (%)]	16 (16.3)	9 (14.3)	1 (10.0)	2 (33.3)	4 (26.7)
40-49 [n (%)]	25 (25.5)	15 (23.8)	5 (50.0)	1 (16.7)	2 (13.3)
50-59 [n (%)]	23 (23.5)	13 (20.6)	2 (20.0)	2 (33.3)	5 (33.3)
60-69 [n (%)]	22 (22.4)	16 (25.4)	2 (20.0)	1 (16.7)	2 (13.3)
70-79 [n (%)]	9 (9.2)	8 (12.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
>80 [n (%)]	3 (3.1)	2 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
<b>Tumor size (cm)</b>					
Mean (SD)	2.85 (2.11)	2.74 (1.94)	3.19 (3.50)	2.40 (0.35)	3.43 (2.27)
Median (IQR)	2.25 (1.80)	2.20 (1.30)	2.10 (1.00)	2.35 (0.30)	3.50 (2.70)
0-1.5 [n (%)]	23 (23.5)	15 (23.8)	3 (30.0)	0 (0.0)	3 (20.0)
1.51-3.0 [n (%)]	48 (48.9)	33 (52.4)	5 (50.0)	6 (100.0)	3 (20.0)
>3.0 [n (%)]	27 (27.6)	15 (23.8)	2 (20.0)	0 (0.0)	9 (60.0)
<b>Histopathological grade [n (%)]</b>					
I	10 (10.4)	7 (11.5)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
II	46 (47.9)	35 (57.4)	4 (40.0)	3 (50.0)	4 (26.7)
III	40 (41.7)	19 (31.1)	5 (50.0)	3 (50.0)	11 (73.3)
Missed	2	2	0	0	0
<b>Histological class [n (%)]</b>					
IDC	93 (94.9)	60 (95.2)	9 (90.0)	6 (100.0)	15 (100.0)
ILC	3 (3.1)	2 (3.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Other	2 (2.0)	1 (1.6)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<b>Tumor stage [n (%)]</b>					
I	21 (21.9)	19 (30.2)	1 (10.0)	0 (0.0)	1 (6.7)
II	43 (44.8)	25 (39.7)	6 (60.0)	5 (83.3)	6 (39.9)
III	24 (25.0)	13 (20.6)	3 (30.0)	0 (0.0)	7 (46.7)
IV	8 (8.3)	6 (9.5)	0 (0.0)	1 (16.7)	1 (6.7)
Unknown	2	0	0	0	0
<b>Lymph node metastasis [n (%)]</b>					
Negative	51 (52.1)	34 (54.0)	5 (50.0)	3 (50.0)	7 (46.7)
Positive	47 (47.9)	29 (46.0)	5 (50.0)	3 (50.0)	8 (53.3)
<b>Survival [n(%)]</b>					
Yes	61 (65.6)	40 (65.6)	8 (80.0)	5 (83.3)	8 (53.3)
No	32 (34.4)	21 (34.4)	2 (20.0)	1 (16.7)	7 (46.7)
Missed	5	2	0	0	0

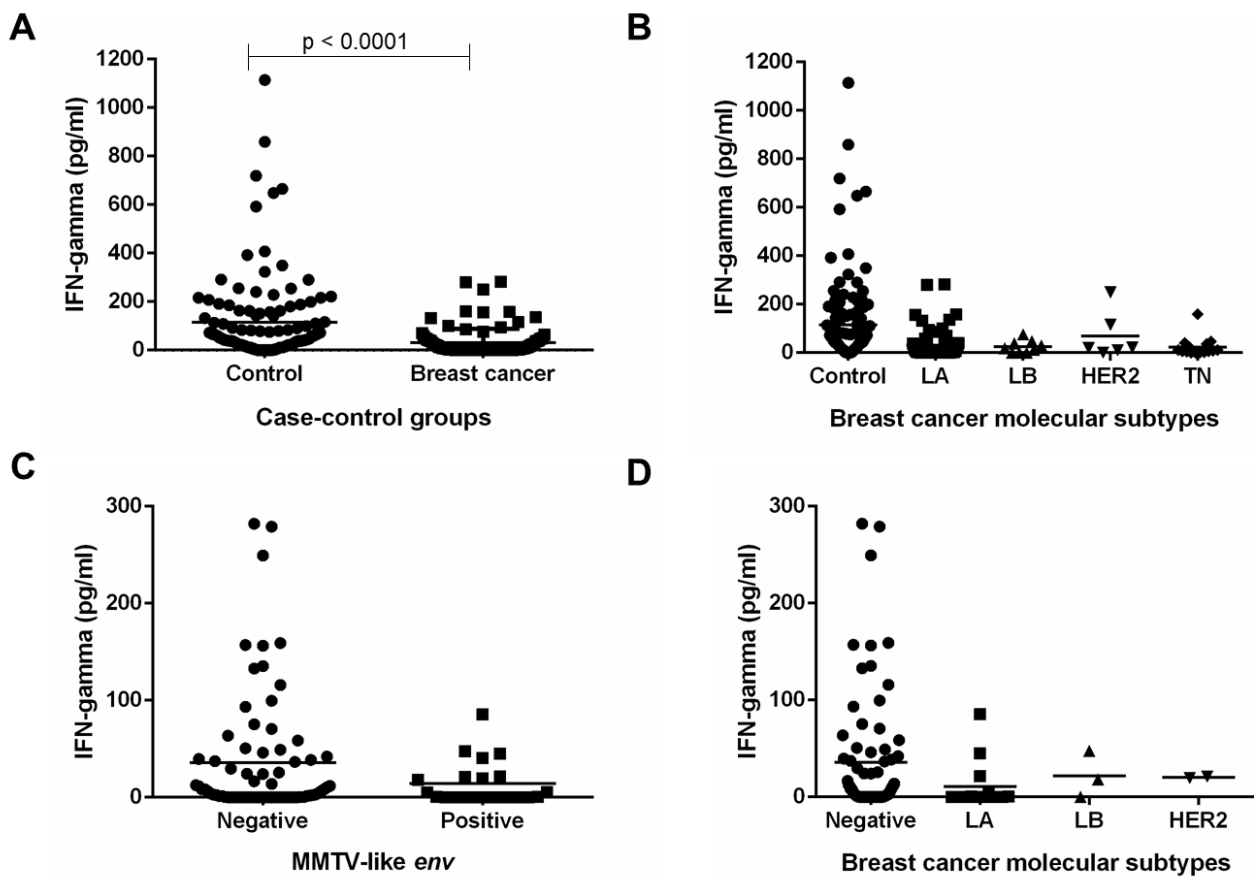
		<b>Ki67 [n (%)]</b>			
Low	22 (23.7)	20 (32.2)	1 (11.2)	0 (0.0)	1 (6.7)
Intermediate	45 (48.4)	35 (56.5)	5 (55.5)	3 (50.0)	1 (6.7)
High	26 (27.9)	7 (11.3)	3 (33.3)	3 (50.0)	13 (86.6)
Missed	5	1	1	0	0
		<b>p53 [n (%)]</b>			
Negative	53 (58.9)	43 (70.5)	1 (14.3)	1 (16.7)	8 (53.3)
Positive	37 (41.1)	18 (29.5)	6 (85.7)	5 (83.3)	7 (46.7)
Missed	8	2	3	0	0

SD: Standard deviation; IQR: interquartile range; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; TN: Triple negative.

### *IFN- $\gamma$ plasma levels in subgroups of BC patients*

In comparison, IFN- $\gamma$  plasma levels in BC samples ( $30.85 \pm 57.49$ pg/ml) were significantly lower than in control group ( $115.00 \pm 176.80$ pg/ml) ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1A). In the analysis by stratified molecular subtypes, Luminal-A ( $30.79 \pm 61.04$ pg/ml;  $p < 0.0001$ ), Luminal-B ( $24.74 \pm 25.78$ pg/ml;  $p = 0.0188$ ) and TN ( $23.95 \pm 40.45$ pg/ml;  $p = 0.0005$ ) had a lower plasma level compared to control group (Figure 1B).

There was no significant difference between IFN- $\gamma$  plasma levels of MMTV-like *env* positive samples compared to MMTV-like *env* negative samples ( $p = 0.2056$ ) (Figure 1C). The same was observed in the stratification of MMTV-like *env* positive samples in relation to the molecular subtypes of BC ( $p = 0.1536$ ) (Figure 1D).



**Figure 1 – IFN-gamma plasma levels in breast cancer patients. A)** Comparison of IFN- $\gamma$  concentration in a case-control study. **B)** IFN- $\gamma$  concentration in breast cancer molecular subtypes. **C)** Comparison of IFN- $\gamma$  concentration between MMTV-like *env* negative and *env* positive samples. **D)** IFN- $\gamma$  concentration in MMTV-like *env* positive samples classified by their molecular subtypes. LA: Luminal A; LB: Luminal B; HER2: Human epidermal growth factor receptor type 2; TN: Triple negative.

#### *Correlations between IFN- $\gamma$ plasma levels and clinicopathological parameters*

For the correlation analyses, we also considered MMTV-like *env* negative and *env* positive tumor tissue samples (Table 2).

In general BC, patients with larger tumor size had higher IFN- $\gamma$  plasma levels (Tau-c = 0.202;  $p = 0.019$ ). By analyzing the MMTV-like *env* negative samples, we could identify that IFN- $\gamma$  plasma levels were higher in larger tumor size (Tau-c = 0.222;  $p = 0.020$ ) and with greater lymph node involvement (Tau-c = 0.258;  $p = 0.042$ ). Also, higher IFN- $\gamma$  plasma levels were observed in patients with higher histopathological grades (Tau-c = 0.384;  $p = 0.019$ ) in MMTV-like *env* positive samples.

**Table 2** – Correlation of plasma IFN- $\gamma$  levels with clinicopathological parameters of breast cancer patients.

Parameter	General BC	MMTV-like <i>env</i> negative	MMTV-like <i>env</i> positive
	Tau ( <i>p</i> -value)	Tau ( <i>p</i> -value)	Tau ( <i>p</i> -value)
Age	0.020 (0.793)	0.029 (0.731)	-0.067 (0.706)
Tumor size	0.202 (0.019*)	0.222 (0.020*)	0.186 (0.321)
Histopathological grade	0.050 (0.602)	-0.050 (0.646)	0.384 (0.019*)
Histological class	-0.018 (0.576)	-0.017 (0.607)	-0.025 (0.768)
Tumor stage	0.100 (0.225)	0.100 (0.287)	0.149 (0.451)
Lymph node metastasis	0.216 (0.054)	0.258 (0.042*)	0.124 (0.592)
Survival	0.018 (0.868)	-0.010 (0.935)	0.027 (0.913)
Estrogen receptor	-0.156 (0.092)	-0.091 (0.412)	-0.290 (0.066)
Progesterone receptor	-0.180 (0.117)	-0.101 (0.448)	-0.417 (0.054)
HER2	0.160 (0.061)	0.137 (0.154)	0.281 (0.156)
Ki67	0.122 (0.201)	0.092 (0.395)	0.308 (0.099)
p53	0.033 (0.783)	0.047 (0.720)	0.062 (0.814)

\**p* < 0.05

## DISCUSSION

Initially, IFN- $\gamma$  plasma levels were evaluated and a decrease in this cytokine levels was observed in BC patients compared to the control group. These findings are contrary to data in the literature, and it has been widely demonstrated that there is an increase in the expression of IFN- $\gamma$  in BC patients (Plüddemann, Mukhopadhyay et al. 2011). Rohani Borj, Andalib et al. (2017) quantified the concentrations of various cytokines, including IFN- $\gamma$ , and higher levels of IFN- $\gamma$  were found in patients with malignant breast tumors compared benign samples. Also, higher levels of these cytokine were observed in patients diagnosed with gastric cancer, being pointed out as a possible marker of reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) infection and diagnosis of early stage of these type of cancer (Cárdenas-Mondragón, Torres et al. 2017, Sánchez-Zauco, Torres et al. 2017). It is noteworthy that in our work, among the stratified BC group, Luminal-A had the highest level of plasma IFN- $\gamma$ , which represents the most frequent BC in the population.

The best-known antitumor effect mediated by IFN- $\gamma$  is the increase in the cytotoxic function of NK cells and cytotoxic T cells as potent effectors of antitumor responses (Ciccarone, Chrivia et al. 1990). Therefore, it is reasonable to think that BC patients can, somehow, present a deficiency in the concentration of IFN- $\gamma$ , with a decrease in the activity of effector immune cells and consequently develop the tumor.

For example, genetic polymorphisms can influence in the level of IFN- $\gamma$  expression, leading to the impaired function or decreased activity of IFN- $\gamma$ , as shown in the meta-analysis carried out by Li, Dai et al. (2014).

Regarding the main BC subtypes, we could observe that Luminal-A, Luminal-B and triple-negative had a lower plasma level compared to control group. Our findings do not corroborate with the literature data. The expression of IFN- $\gamma$  genes in tumor tissue was evaluated by Heimes, Härtner et al. (2020), who demonstrated that a greater expression of the IFN- $\gamma$  gene signature is associated with a better prognosis of BC, being particularly pronounced in Luminal B.

In our study, it was not possible to establish a difference in IFN- $\gamma$  plasma levels in negative and positive samples for the presence of the MMTV-like *env* gene. Using *in vitro* analyses, Fernandez-Cobo, Melana et al. (2006) showed that MCF-7 *env+* cell line expressed more IFN-related genes in comparison to MCF-7 *env-* cell line, which may suggest that they are responding to an infectious agent. In mice, both IFN- $\alpha$  and - $\beta$  and, also, IFN- $\gamma$  seems to not play an essential role in immunological events triggered by the SAg expressed by the MMTV viral particle (Maillard, Launois et al. 1998). In addition, the authors reported that there was no increase in the amount of proviral DNA in the infected lymph nodes of mice. IFN effects have been shown to be more important in controlling cytopathic viruses such as vesicular stomatitis virus (VSV) and vaccinia virus (Huang, Hendriks et al. 1993, Müller, Steinhoff et al. 1994). Since MMTV is a noncytopathic virus, the apparent lack of an antiviral effect of these cytokines on MMTV infection can be interpreted in this context.

Studies have highlighted the potential of IFN- $\gamma$  to promote the development of more aggressive phenotypes in cancer cells. As a result of extensive studies over the last three decades, it is evident that IFN- $\gamma$  can facilitate tumor initiation and promote changes in tumor phenotype to increase the growth capacity of the immunocompetent host and also promote an immunosuppressive tumor microenvironment (Taniguchi, Petersson et al. 1987, Garbe, Krasagakis et al. 1990, Lollini, Bosco et al. 1993, Bernabei, Coccia et al. 2001). Interestingly, when we investigate the plasma levels of this cytokine compared to clinicopathological parameters of BC patients, there was a positive correlation with clinicopathological parameters of worse prognosis, such as lymph node involvement, tumor size and histopathological grade. In a study with non-small cell lung cancer patients, high

levels of IFN- $\gamma$  were observed in stage IV patients (Lee, Chung et al. 2021). Given the dual role of IFN- $\gamma$ , a study carried out by Lee, Huang et al. (2013) showed that low plasma levels of IFN- $\gamma$  are associated with more advanced tumor staging and larger tumor size in patients with hepatocellular carcinoma.

Although not significant, IFN- $\gamma$  plasma levels were lower in positive compared to negative MMTV-like *env* samples. However, higher IFN- $\gamma$  plasma levels were observed in patients with higher histopathological grades, indicating a correlation with the patient's worse prognosis. It has been shown that MMTV-like positive cell lines express genes that are associated with increased cell growth, a fact that may be related to their more malignant phenotype (Fernandez-Cobo, Melana et al. 2006). In a previous work published by our research group, we demonstrated, in a larger sample group, that MMTV-like *env* positivity is associated with better prognostic parameters in BC subtypes (de Sousa Pereira, Akelington Freire Vitiello et al. 2020). Thus, we can observe a potential controversial role of the IFN- $\gamma$  in the tumor microenvironment of MMTV-like *env* positive BC.

In conclusion, we can observe that the role of IFN- $\gamma$  in the tumor microenvironment remains ambiguous when evaluating plasma levels of this cytokine in general BC and control group. Likewise, in MMTV-like *env* negative and positive samples, it is unclear whether the high levels of IFN- $\gamma$  in MMTV-like *env* positive samples are reflecting a possible antiviral immune response or whether this cytokine is promoting tumor growth, considering that it was only possible to detect the MMTV-like DNA, which does not mean that the virus is active in the tumor microenvironment. As this is the first study to assess the association between plasma levels of IFN- $\gamma$  and the presence of the MMTV-like *env* gene in BC samples, further studies should be performed to demonstrate the role of the cytokine IFN- $\gamma$  in the development of BC with the presence of MMTV-like DNA or/and RNA in the tumor microenvironment.

## **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).

**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**

- 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.
- Bernabei, P., E. M. Coccia, L. Rigamonti, M. Bosticardo, G. Forni, S. Pestka, C. D. Krause, A. Battistini and F. Novelli (2001). "Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death." J Leukoc Biol **70**(6): 950-960.
- Bittner, J. J. (1936). "Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice." Science **84**(2172): 162.
- Brierley, J., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). TNM Classification of Malignant Tumours. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.
- Cárdenas-Mondragón, M. G., J. Torres, N. Sánchez-Zauco, A. Gómez-Delgado, M. Camorlinga-Ponce, C. Maldonado-Bernal and E. M. Fuentes-Pananá (2017). "Elevated Levels of Interferon- $\gamma$  Are Associated with High Levels of Epstein-Barr Virus Reactivation in Patients with the Intestinal Type of Gastric Cancer." Journal of Immunology Research **2017**: 7069242.
- Castro, F., A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves, K. Serre and M. J. Oliveira (2018). "Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion." Frontiers in Immunology **9**(847).
- Ciccarone, V. C., J. Chrivia, K. J. Hardy and H. A. Young (1990). "Identification of enhancer-like elements in human IFN-gamma genomic DNA." J Immunol **144**(2): 725-730.
- de Sousa Pereira, N., G. Akelington Freire Vitiello, B. Karina Banin-Hirata, G. Scantamburlo Alves Fernandes, M. José Sparça Salles, M. Karine Amarante and M. Angelica Ehara Watanabe (2020). "Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-Like env Sequence in Brazilian Breast Cancer Samples: Implications in Clinicopathological Parameters in Molecular Subtypes." International Journal of Environmental Research and Public Health **17**(24): 9496.
- Fernandez-Cobo, M., S. M. Melana, J. F. Holland and B. G. T. Pogo (2006). "Transcription profile of a human breast cancer cell line expressing MMTV-like sequences." Infectious Agents and Cancer **1**(1): 7.
- Garbe, C., K. Krasagakis, C. C. Zouboulis, K. Schröder, S. Krüger, R. Stadler and C. E. Orfanos (1990). "Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype." J Invest Dermatol **95**(6 Suppl): 231s-237s.
- Goldhirsch, A., J. N. Ingle, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann and H. J. Senn (2009). "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009." Ann Oncol **20**(8):

1319-1329.

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.

Heimes, A.-S., F. Härtner, K. Almstedt, S. Krajnak, A. Lebrecht, M. J. Battista, K. Edlund, W. Brenner, A. Hasenburg, U. Sahin, M. Gehrman, J. G. Hengstler and M. Schmidt (2020). "Prognostic Significance of Interferon- $\gamma$  and Its Signaling Pathway in Early Breast Cancer Depends on the Molecular Subtypes." International Journal of Molecular Sciences **21**(19): 7178.

Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel and M. Aguet (1993). "Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor." Science **259**(5102): 1742-1745.

Kirby, L. T. (1990). DNA Fingerprint. Londres, Palgrave Macmillan UK.

Lawson, J. S. and W. K. Glenn (2019). "Evidence for a causal role by mouse mammary tumour-like virus in human breast cancer." npj Breast Cancer **5**(1): 40.

Lee, I.-C., Y.-H. Huang, G.-Y. Chau, T.-I. Huo, C.-W. Su, J.-C. Wu and H.-C. Lin (2013). "Serum interferon gamma level predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients after curative treatments." International Journal of Cancer **133**(12): 2895-2902.

Lee, K.-S., W.-Y. Chung, J.-E. Park, Y.-J. Jung, J.-H. Park, S.-S. Sheen and K.-J. Park (2021). "Interferon- $\gamma$ -Inducible Chemokines as Prognostic Markers for Lung Cancer." International Journal of Environmental Research and Public Health **18**(17): 9345.

Li, C.-J., Y. Dai, Y.-J. Fu, J.-M. Tian, J.-L. Li, H.-J. Lu, F. Duan and Q.-W. Li (2014). "RETRACTED ARTICLE: Correlations of IFN- $\gamma$  genetic polymorphisms with susceptibility to breastcancer: a meta-analysis." Tumor Biology **35**(7): 6867-6877.

Liu, B., Y. Wang, S. M. Melana, I. Pelisson, V. Najfeld, J. F. Holland and B. G. Pogo (2001). "Identification of a proviral structure in human breast cancer." Cancer Res **61**(4): 1754-1759.

Lollini, P. L., M. C. Bosco, F. Cavallo, C. De Giovanni, M. Giovarelli, L. Landuzzi, P. Musiani, A. Modesti, G. Nicoletti, G. Palmieri and et al. (1993). "Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene." Int J Cancer **55**(2): 320-329.

Maillard, I., P. Launois, I. Xenarios, J. A. Louis, H. Acha-Orbea and H. Diggelmann (1998). "Immune Response to Mouse Mammary Tumor Virus in Mice Lacking the Alpha/Beta Interferon or the Gamma Interferon Receptor." Journal of Virology **72**(4): 2638-2646.

Müller, U., U. Steinhoff, L. F. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel and M. Aguet (1994). "Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense." Science **264**(5167): 1918-1921.

Plüddemann, A., S. Mukhopadhyay and S. Gordon (2011). "Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to microbial entry." Immunol Rev **240**(1): 11-24.

Rohani Borj, M., A. R. Andalib, A. Mohammadi, S. M. Hoseiniharouni, H.

Pourghadamyari, H. Azizi, T. Golmahammadi and K. Moghaddas Ghahfarokhy (2017). "Evaluation of IL-4, IL-17, and IFN- $\gamma$  Levels in Patients With Breast Cancer." Int J Basic Sci Med **2**(1): 20-24.

Ross, S. R. (2008). "MMTV infectious cycle and the contribution of virus-encoded proteins to transformation of mammary tissue." Journal of mammary gland biology and neoplasia **13**(3): 299-307.

Ross, S. R. (2010). "Mouse Mammary Tumor Virus Molecular Biology and Oncogenesis." Viruses **2**: 2000-2012.

Sánchez-Zauco, N., J. Torres, A. Gómez, M. Camorlinga-Ponce, L. Muñoz-Pérez, R. Herrera-Goepfert, R. Medrano-Guzmán, S. Giono-Cerezo and C. Maldonado-Bernal (2017). "Circulating blood levels of IL-6, IFN- $\gamma$ , and IL-10 as potential diagnostic biomarkers in gastric cancer: a controlled study." BMC Cancer **17**(1): 384.

Seliger, B., F. Ruiz-Cabello and F. Garrido (2008). "IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors." Adv Cancer Res **101**: 249-276.

Taniguchi, K., M. Petersson, P. Höglund, R. Kiessling, G. Klein and K. Kärre (1987). "Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3405-3409.

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.

### 3.4 ARTIGO 4 – “*TP53* GENE POLYMORPHISM GENOTYPES AND DETECTION OF THE MMTV-LIKE *ENV* GENE IN BRAZILIAN BREAST CANCER PATIENTS”

#### ABSTRACT

The p53 protein is one of the best-known tumor suppressor proteins and contributes to the immune response to eradicate pathogens, such as viruses. Somatic mutations in the p53 protein are a frequent feature in most tumors, including breast cancer (BC). The mutated allele leads to defective production of the p53 protein, preventing it from binding to DNA and activating gene transcription. Viral involvement in the development of human BC has been widely explored. In this context, homologous gene sequences to those of mouse mammary tumor virus (MMTV) were identified in human tumor samples, thus demonstrating the presence of genetic material from a virus that was named human mammary tumor virus (MMTV-like). Despite a great effort to demonstrate the association of MMTV-like with human BC, little is known about the involvement of antiviral immune responses in the tumor microenvironment. The gene that encodes the p53 protein, *TP53*, has a single nucleotide polymorphism (SNP), the rs1042522 (Arg72Pro), in which a guanine (G) is exchanged by a cytosine (C). In the presence of G, the genetic sequence encodes the amino acid arginine (Arg). On the other hand, when there is an exchange for a C, the encoded amino acid is proline (Pro). Studies have shown that the presence of Arg is more compelling to apoptosis, while the presence of Pro induces cell cycle blockage and DNA repair. Thus, the aim of this study was to evaluate the Arg72Pro polymorphism and the association of genotypes with the presence of MMTV-like in BC patients. Genomic DNA was obtained from a total of 372 healthy women and 215 BC patients. MMTV-like *env* sequence was evaluated through nested-PCR and Arg72Pro through allele-specific PCR. For all data, the level of significance was set at  $p < 0.05$ . MMTV-like *env* gene was detected in 19.1%. The Pro/Pro genotype was associated with protection against the development of BC ( $p < 0.0289$ ; OR: 0.33; CI: 0.12-0.88). No association was observed between the somatic mutation in the p53 protein with the presence of the MMTV-like *env* gene in BC samples. Regarding negative and positive samples for the presence of the MMTV-like gene sequence and the *TP53* polymorphism genotypes, no significant association was observed. In general BC, a positive correlation was observed between the *TP53* genotypes and age (Tau-c = 0.143;  $p = 0.025$ ) and between Pro carrier and histopathological grade (Tau-b = 0.162;  $p = 0.016$ ). By analyzing the MMTV-like negative samples, we could verify that Pro carrier are negatively correlated with p53 expression (Tau-b = -0.166;  $p = 0.032$ ). Here, we verified an association of the Pro/Pro genotype with disease protection and no association was found between *TP53* genotypes and the presence or absence of MMTV-like *env* gene, being the first work to seek such association. Despite this, we can observe that patients carrying the Pro allele had significant correlation with clinicopathological characteristics, such as higher histopathological grade and older age at diagnosis. However, the Pro allele in general BC was correlated with p53-negative breast tumors. In MMTV-like *env* positive samples, the Pro allele, although not significant, was correlated with a greater remission of these patients. Considering all these results, further studies should be performed with BC to clarify the involvement of the Arg72Pro polymorphism and the expression of p53 in MMTV-like *env* positive and negative tumors.

**Keywords:** breast carcinoma; polymorphism; antiviral; tumor microenvironment.

## INTRODUCTION

The p53 protein is one of the best-known tumor suppressor proteins and acts as a regulator of several important cell signaling pathways. The activation of the p53 protein takes place in response to several sources of cellular stresses, such as damage to cellular DNA, leading to an accumulation of the protein in the cell. The suppressive activity of p53 results in the transcriptional regulation of other genes that are involved in various processes, such as cell cycle arrest, apoptosis, cell aging (senescence), DNA repair and cell differentiation (van Heemst, Mooijaart et al. 2005, Biegging, Mello et al. 2014, Hashimoto, Nagano et al. 2019). Somatic mutations present in the p53 protein are a frequent feature in most naturally occurring tumors, being observed in 50% of primary tumors. In breast cancer (BC), these mutations can be observed in up to 85% of cases. The mutated allele leads to defective production of the p53 protein, preventing it from binding to DNA and activating gene transcription (Hollstein, Sidransky et al. 1991, Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011).

In addition, the p53 protein contributes to the immune response to eradicate pathogens, such as viruses (Taura, Eguma et al. 2008, Hacke, Rincon-Orozco et al. 2010, Rivas, Aaronson et al. 2010). Viral involvement in the development of human BC has been widely explored by several researchers, especially after the association of mouse mammary tumor virus (MMTV) with the development of BC in mice (Bittner 1936). In this context, homologous gene sequences to those of MMTV were identified in human tumor samples (Liu, Wang et al. 2001), thus demonstrating the presence of genetic material from a virus that was named human mammary tumor virus (MMTV-like). The prevalence of the gene sequence, characterized by the *env* gene, in BC samples varies among populations (Amarante, de Sousa Pereira et al. 2019, Lawson and Glenn 2019). Despite a great effort to demonstrate the association of MMTV-like with BC human, little is known about the involvement of antiviral immune responses in the tumor microenvironment.

The gene that encodes the p53 protein, *TP53*, has several genetic polymorphisms. The most prominent is the rs1042522 (Arg72Pro), which consists of a single nucleotide polymorphism (SNP), in which a guanine (G) is exchanged by a

cytosine (C), causing structural changes in the protein and, consequently, influencing its activity (Thomas, Kalita et al. 1999, Thomas, Kalita et al. 1999, Dumont, Leu et al. 2003, Bergamaschi, Samuels et al. 2006). In the presence of G at codon 72 (CGC), the genetic sequence encodes the amino acid arginine (Arg). On the other hand, when there is an exchange for a C in the same region (CCC), the encoded amino acid is proline (Pro) (Matlashewski, Tuck et al. 1987). Studies have shown that the presence of the amino acid Arg is more compelling to apoptosis, while the presence of Pro induces cell cycle blockage and DNA repair (Dumont, Leu et al. 2003, Pim and Banks 2004, Siddique and Sabapathy 2006).

Thus, the aim of this study was to evaluate the rs1042522 Arg72Pro polymorphism in BC patients, also associate the genotypes with the presence of MMTV-like env gene and correlate with clinicopathological parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Human Subjects*

Our study was approved by the Human Ethics Committee of Londrina State University (CAAE 73557317.0.0000.5231 and CAAE 47709015.2.0000.5231). All women enrolled in this study signed a form of free-informed consent prior to the collection of biological material. This case-control study included a group of 372 healthy women and a group of 215 BC patients.

For the control group, peripheral blood samples were collected from women attended at the Clinical Hospital of Londrina State University. Inclusion criteria were the absence of a history of BC, proven by clinical examination and updated mammography at the time of collection, absence of cases of BC in the family and absence of infections or autoimmune diseases. As a way of pairing the samples from the two groups used in this study, the control samples were collected in the same geographic region as the BC patients.

Women diagnosed with BC were invited to participate during the clinical care in Londrina Cancer Hospital (LHC), Londrina, PR, Brazil, all of them were attended by the Brazilian Public Health System (SUS). During breast tumor surgery, the responsible surgeon collected the biological samples, which consisted of peripheral blood and tumor tissue. Then, these samples were sent to the Laboratory of DNA Polymorphisms and Immunology for processing. Clinicopathological features, such

as age at diagnosis, tumor size, histopathological grade, lymph node metastasis (LNM) status, pathological disease stage, survival and immunostaining for Ki67 (cellular proliferation index), p53, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), were retrieved from patients' medical records. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria (Brierley, Gospodarowicz et al. 2017). Immunohistochemical (IHC) analysis for ER, PR and HER2 were performed as a clinical routine in the Laboratory of Clinical Pathology of the LCH, following standard protocol (Hammond, Hayes et al. 2010, Wolff, Hammond et al. 2013). Expression of Ki67 was assessed through IHC and BC was classified according to the number of tumor cells expressing Ki67 in low (15%), intermediate (16%–30%), or high (>30%) expression groups (Goldhirsch, Ingle et al. 2009). Immunostaining for p53 protein was used as an indirect indicator of missense mutations in the tumor suppressor *TP53* gene. A total of 215 BC samples were included in this work and only 200 women had enough data in their medical records to molecularly classify their tumors.

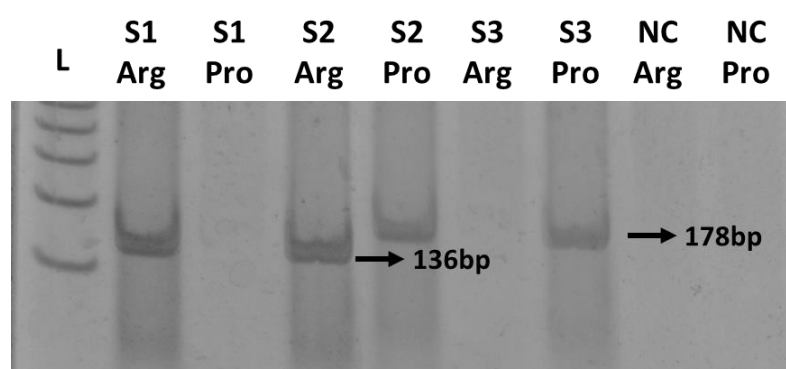
#### *DNA extraction*

Peripheral blood was collected in an ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tube and DNA was extracted using the Biopur MiniSpin kit (Biometrix diagnóstica, Curitiba, PR, Brazil), according to the manufacturer's standards. Tumor tissue was mechanically dissociated under aseptic conditions and genomic DNA was obtained by the salting-out method (Kirby 1990). All DNA samples were quantified in a NanoDrop-2000c spectrophotometer (Thermo-Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) at a wavelength of 260nm. DNA samples were stored at -20°C and adjusted to a concentration of 100ng/μL prior to use.

#### *Polymorphism rs1042522 Arg72Pro of the TP53 gene*

The primers used for the rs1042522 Arg72Pro of *TP53* gene polymorphism assay were synthesized as described by Aoki, da Silva do Amaral Herrera et al. (2009). Amplification reactions were performed using 1x Buffer (20mM Tris-HCl pH 8.5; 50mM KCl), 75 μM dNTP, 0.1μM of each primer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> and 1.25U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The amplification reaction took place in a Biocycler thermocycler (Biosystems, Brazil), under the

following conditions: 94°C for 3 minutes; followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 61°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds; and a final extension step at 72°C for 5 minutes. Genomic DNA known to be heterozygous for the Arg72Pro polymorphism was used as a positive control in all PCR reactions. The negative control was performed without adding DNA and was also used in all PCR reactions. After amplification, the PCR product was submitted to 10% polyacrylamide gel electrophoresis and stained with silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). The electrophoretic profile for the polymorphism Arg72Pro of the *TP53* gene is demonstrated in Figure 1, which shows the PCR fragments for Arg/Arg (136 bp), Arg/Pro (178 bp and 136 bp) and Pro/Pro (178 bp) genotypes.



**Figure 1. Electrophoretic profile for the polymorphism rs1042522 Arg72Pro of the *TP53* gene.** L: 100bp ladder marker (Invitrogen, USA); S1: Arg/Arg sample; S2: Arg/Pro sample; S3: Pro/Pro sample; NC: negative control.

#### *Nested PCR for MMTV-like env gene*

Conditions for the amplification of the MMTV-like *env* gene were described in a previous work by our research group (de Sousa Pereira, Akelinghton Freire Vitiello et al. 2020). Therefore, in this study, we used data from this article to assess the relationship between Arg72Pro genotypes and the presence of MMTV-like in tumor tissue.

#### *Statistical analysis*

Association analyzes were performed using chi-square test. Correlation analyzes were performed by calculating the Kendall's Tau-b and Tau-c coefficients. For statistical analyses, the following statistical programs were used: SPSS Statistics

20.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA) and GraphPad Prism version 6.1 (GraphPad Software Inc. San Diego, California, USA). For all data, the significance level adopted was  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The clinicopathological features of BC are shown in Table 1.

**Table 1** – Clinicopathological characteristics of the patients.

Parameter	Breast cancer subgroups				
	Total (n = 215)	Luminal-A (n = 139)	Luminal-B (n = 24)	HER2 (n = 12)	TN (n = 25)
<b>Age (years)</b>					
Mean (SD)	56 (13)	57 (13)	53 (10)	54 (17)	55 (15)
Median (IQR)	54 (19)	56 (18)	50 (18)	51 (19)	51 (22)
<40 [n (%)]	24 (11.2)	12 (8.7)	4 (16.7)	0 (0.0)	6 (24.0)
40-49 [n (%)]	58 (27.1)	39 (28.3)	7 (29.2)	4 (33.4)	4 (16.0)
50-59 [n (%)]	50 (23.4)	34 (24.6)	5 (20.8)	2 (16.6)	5 (20.0)
60-69 [n (%)]	45 (21.0)	30 (21.7)	4 (16.7)	1 (8.3)	7 (28.0)
70-79 [n (%)]	28 (13.1)	19 (13.8)	1 (4.1)	4 (33.4)	2 (8.0)
>80 [n (%)]	9 (4.2)	4 (2.9)	3 (12.5)	1 (8.3)	1 (4.0)
Missed [n (%)]	1	1	0	0	0
<b>Tumor size (cm)</b>					
Mean (SD)	2.8 (1.9)	2.6 (1.8)	2.8 (2.3)	2.5 (1.3)	3.8 (2.0)
Median (IQR)	2.2 (1.7)	2.0 (1.50)	2.2 (1.1)	2.2 (0.9)	3.5 (2.5)
0-1.5 [n (%)]	28 (13.1)	19 (13.8)	4 (16.7)	0 (0.0)	3 (12.0)
1.51-3.0 [n (%)]	131 (61.5)	87 (63.0)	12 (50.0)	8 (66.7)	13 (52.0)
>3.0 [n (%)]	54 (25.4)	32 (23.2)	8 (33.3)	4 (33.3)	9 (36.0)
Missed	2	1	0	0	0
<b>Histopathological grade [n (%)]</b>					
I	28 (13.9)	24 (18.5)	1 (4.2)	0 (0.0)	0 (0.0)
II	85 (42.1)	63 (48.5)	9 (37.5)	4 (36.4)	6 (24.0)
III	89 (44.0)	43 (33.0)	14 (58.3)	7 (63.6)	19 (76.0)
Missed	13	9	0	1	0
<b>Histological Class [n (%)]</b>					
IDC	193 (90.6)	126 (92.0)	22 (91.7)	10 (83.3)	24 (96.0)
ILC	6 (2.8)	4 (2.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (4.0)
Other	14 (6.6)	7 (5.1)	2 (8.3)	2 (16.7)	0 (0.0)
Missed	2	2	0	0	0
<b>Tumor stage [n (%)]</b>					
0	10 (6.0)	5 (4.7)	1 (5.3)	2 (16.7)	0 (0.0)
I	36 (21.6)	29 (27.4)	3 (15.8)	2 (16.7)	2 (8.3)
II	69 (41.3)	40 (37.7)	9 (47.4)	6 (50.0)	11 (45.8)
III	43 (25.7)	25 (23.6)	6 (31.5)	1 (8.3)	10 (41.7)
IV	9 (5.4)	7 (6.6)	0 (0.0)	1 (8.3)	1 (4.2)
Unknown	48	33	5	0	1
<b>Lymph node metastasis [n (%)]</b>					
Positive	97 (46.9)	62 (45.3)	12 (54.5)	3 (27.3)	12 (48.0)
Negative	110 (53.1)	75 (54.7)	10 (45.5)	8 (72.7)	13 (52.0)
Missed	8	2	2	1	0
<b>Survival [n (%)]</b>					
Yes	116 (63.0)	82 (66.1)	14 (63.6)	6 (60.0)	13 (54.2)
No	68 (37.0)	42 (33.9)	8 (36.4)	4 (40.0)	11 (45.8)
Missed	31	13	2	2	1

		<b>Ki67 [n (%)]</b>			
Low	48 (25.9)	43 (34.1)	3 (14.2)	0 (0.0)	1 (4.2)
Intermediate	79 (42.7)	60 (47.6)	9 (42.9)	4 (40.0)	5 (20.8)
High	58 (31.4)	23 (18.3)	9 (42.9)	6 (60.0)	18 (75.0)
Missed	30	13	3	2	1
		<b>p53 [n (%)]</b>			
Positive	66 (34.2)	31 (23.5)	11 (55.0)	7 (63.6)	14 (56.0)
Negative	127 (65.8)	101 (76.5)	9 (45.0)	4 (36.4)	11 (44.0)
Missed	22	7	4	1	0

TN: triple-negative; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; SD: standard deviation; IQR: interquartile range.

In the analyzed samples, we were able to observe all genotypes of the *TP53* gene polymorphism: Arg/Arg, Arg/Pro and Pro/Pro. The Arg/Arg genotype was observed in 58.6% (126/215), Arg/Pro genotype was observed in 39.1% (84/215) and Pro/Pro genotype was observed in 2.3% (5/215) BC patients.

*Association analyses between TP53 genotypes in control and BC samples and detection of MMTV-like env gene*

A case-control association analysis was performed for the *TP53* genotypes and the Pro allele carrier. In our work, it was observed that the Pro/Pro homozygous genotype protects the development of BC ( $p < 0.0289$ ; Odds Ratio: 0.33; Confidence Interval: 0.12-0.88) (Table 2).

**Table 2** - Association analyses between *TP53* genotypes in control and breast cancer samples

<b>TP53</b>	<b>Groups</b>		$\chi^2$ p-value	<b>Odds Ratio (CI 95%)</b>
	<b>Control</b>	<b>Breast Cancer</b>		
<b>Genotypes</b>				
Arg/Arg [n (%)]	218 (58.6)	126 (58.6)		
Arg/Pro [n (%)]	128 (34.4)	84 (39.1)	0.5285	1.13 (0.79-1.61)
Pro/Pro [n (%)]	26 (7.0)	5 (2.3)	0.0289*	0.33 (0.12-0.88)
<b>Pro Carrier</b>				
Arg/Arg [n (%)]	218 (58.6)	126 (58.6)		
Pro [n (%)]	154 (41.4)	89 (41.4)	1.0000	0.99 (0.71-1.40)

$\chi^2$ : Chi-squared test; CI: confidence interval.

Regarding negative and positive samples for the presence of the MMTV-like *env* gene and *TP53* polymorphism genotypes, no significant association was observed in the analyzed BC samples (Table 3).

**Table 3** - Association analyses between *TP53* genotypes and detection of MMTV-like *env* gene in BC samples

<i>TP53</i>	MMTV-like		$\chi^2$ p-value	Odds Ratio (IC 95%)
	Negative	Positive		
<b>Genotypes</b>				
Arg/Arg [n (%)]	107 (61.5)	19 (46.3)		
Arg/Pro [n (%)]	63 (36.2)	21 (51.2)	0.1056	1.88 (0.94-3.76)
Pro/Pro [n (%)]	4 (2.3)	1 (2.5)	0.5693	1.41 (0.15-13.30)
<b>Pro Carrier</b>				
Arg/Arg [n (%)]	107 (61.5)	19 (46.3)		
Pro [n (%)]	67 (38.5)	22 (53.7)	0.0813	1.85 (0.93-3.67)

$\chi^2$ : Chi-squared test; CI: confidence interval

*Association analyses between p53 positivity by IHC and detection of MMTV-like env gene in BC samples*

Since some viruses, which have already been associated with tumor development, have mechanisms capable of inhibiting the tumor suppressor activity of the p53 protein, we searched for an association between expression of p53 protein by IHC and the presence of MMTV-like *env* gene. As shown in Table 4, no association was observed between the expression of the p53 tumor suppressor protein with the presence of the MMTV-like *env* gene in BC samples.

**Table 4** - Association analyses between expression of p53 protein and detection of MMTV-like *env* gene in BC samples

<i>p53</i>	MMTV-like		$\chi^2$ p-value	Odds Ratio (IC 95%)
	Negative	Positive		
Negative [n (%)]	107 (67.7)	20 (57.2)		
Positive [n (%)]	51 (32.3)	15 (42.8)	0.2430	1.57 (0.74-3.32)

*p53* mutation (IHC);  $\chi^2$ : Chi-squared test; CI: confidence interval.

*Correlations between TP53 genotypes and clinicopathological features in MMTV-like tumor samples.*

Finally, we decided to investigate whether the *TP53* polymorphism genotypes would be correlated with clinicopathological parameters of BC patients and those who were negative and positive for the presence of the MMTV-like *env* gene. Results obtained are shown in Table 5.

In general BC, the Pro carrier had a higher histopathological grade compared to patients with the Arg/Arg genotype (Tau-b = 0.162; p = 0.016). By analyzing the MMTV-like *env* negative samples, we could identify that Arg/Arg and Arg/Pro patients had lower age at diagnosis than patients with Pro allele in homozygous (Tau-c = 0.143; p = 0.025) and that Pro carrier are mostly negative for the p53 expression

(Tau-b = -0.166; p = 0.032).

Although not significant, we did observe some trends in the correlation analyses. In MMTV-like *env* negative samples, it was observed that Arg/Arg and Arg/Pro patients had tumors with higher staging compared to Pro/Pro patients (Tau-b = 0.142; p = 0.053). In MMTV-like *env* positive samples, this trend was observed between the Pro carrier and the patient's survival, showing a greater remission in patients carrying the Pro allele (Tau-b = 0.304; p = 0.052).

**Table 5** – Correlation analyses between *TP53* genotypes and clinicopathological parameters in BC samples

Parameter	Breast Cancer		MMTV-like <i>env</i> negative		MMTV-like <i>env</i> positive	
	<i>TP53</i> genotypes	Pro Carrier	<i>TP53</i> genotypes	Pro Carrier	<i>TP53</i> genotypes	Pro Carrier
	Tau (p-value)	Tau (p-value)	Tau (p-value)	Tau (p-value)	Tau (p-value)	Tau (p-value)
Age	0.065 (0.244)	-0.059 (0.450)	0.143 (0.025*)	-0.021 (0.810)	-0.216 (0.076)	-0.220 (0.213)
Tumor size	0.008 (0.884)	-0.134 (0.084)	0.000 (1.000)	-0.158 (0.066)	-0.004 (0.979)	-0.040 (0.820)
Histopathological grade	0.050 (0.458)	0.162 (0.016*)	0.030 (0.694)	0.147 (0.051)	0.106 (0.478)	0.206 (0.171)
Histological class	0.048 (0.476)	-0.017 (0.804)	0.085 (0.267)	-0.010 (0.898)	-0.108 (0.469)	-0.050 (0.742)
Tumor stage	0.110 (0.104)	-0.043 (0.563)	0.142 (0.053)	-0.041 (0.624)	0.000 (1.000)	-0.035 (0.836)
Lymph node metastasis	0.092 (0.181)	-0.069 (0.324)	0.084 (0.272)	-0.061 (0.435)	0.125 (0.421)	-0.103 (0.513)
Survival	-0.103 (0.160)	0.008 (0.919)	-0.067 (0.414)	-0.068 (0.423)	-0.207 (0.194)	0.304 (0.052)
Estrogen receptor	-0.035 (0.630)	0.004 (0.956)	-0.035 (0.630)	0.025 (0.747)	0.096 (0.527)	-0.089 (0.575)
Progesterone receptor	-0.004 (0.956)	0.025 (0.719)	-0.068 (0.413)	0.043 (0.582)	0.066 (0.669)	-0.045 (0.774)
HER2	-0.008 (0.905)	-0.083 (0.235)	-0.063 (0.393)	-0.072 (0.355)	0.100 (0.513)	-0.155 (0.326)
Ki67	-0.030 (0.668)	-0.005 (0.942)	-0.066 (0.391)	-0.007 (0.932)	0.111 (0.497)	0.003 (0.986)
p53	0.011 (0.875)	-0.086 (0.234)	-0.021 (0.793)	-0.166 (0.032*)	0.109 (0.514)	0.198 (0.233)
MMTV-like <i>env</i>	0.116 (0.092)	0.035 (0.618)	-	-	-	-

\*p&lt;0,05

## DISCUSSION

The relationship between p53 protein and the presence of MMTV-like has been explored in several studies. In a study of Pogo, Melana et al. (1999), a non-significant increase in p53 protein expression, evaluated by IHC, was observed in MMTV-like *env* positive samples. This association was proven by Lawson, Tran et al. (2004), in which they showed there was an increased intensity of p53 protein expression in MMTV-like *env* positive BC specimens as compared to BC samples in which these sequences are absent. Furthermore, the accumulation of p53 protein in the cell nucleus was more prominent in samples that contained the MMTV-like gene sequences, indicating a possible participation of both in the development of more aggressive breast tumors (Faedo, Ford et al. 2004). However, other studies have not shown a significant association between the p53 protein and the presence of the MMTV-like *env* gene in BC samples (Hachana, Trimeche et al. 2008, Mok, Lawson et al. 2008). In this work, we also did not observe an association between p53 protein and the presence of MMTV-like *env* gene in Brazilian BC samples. This finding corroborates with previous findings from our research group, which demonstrated that MMTV-like *env* positive patients have a better prognosis compared to MMTV-like *env* negative patients (de Sousa Pereira, Akelington Freire Vitiello et al. 2020).

The association between p53 codon 72 polymorphism and the risk of developing BC has been studied in different populations with conflicting results. These divergences in frequency distribution can be explained by the characteristics of the ethnic group (Thomas, Kalita et al. 1999, Murphy 2006). In a meta-analysis carried out by van Heemst, Mooijaart et al. (2005), it was observed that homozygous proline is more oncogenic than homozygous arginine, this statement is strengthened by the fact that proline has a lower potential for apoptosis (Dumont, Leu et al. 2003). More recent studies have also shown an association of the Pro allele with the risk of developing BC (Proestling, Hebar et al. 2012, Ayoubi, Elkarroumi et al. 2018). However, Papadakis, Dokianakis et al. (2000) have reported that Arg in homozygosis is a risk factor for BC. This is, in a way, in agreement with our findings, as we observed that the Pro/Pro homozygous genotype is a protective factor in the development of BC. Interestingly, a previous study carried out by our research group was observed, in a smaller sample group, a positive association for the homozygous GG (Arg/Arg) genotype was observed in BC women (Aoki, da Silva do Amaral Herrera et al. 2009).

In this work, we demonstrate for the first time a lack of association between genotypes of the Arg72Pro polymorphism in *TP53* gene and the detection of the MMTV-like *env* gene in human breast tumor samples. The relation of this polymorphism with tumors associated with human papilloma virus (HPV) infection has been explored. Xia, Zeng et al. (2013), through a meta-analysis, observed that there is no association between the *TP53* gene Arg72Pro polymorphism and the risk of developing head and neck squamous cell carcinoma associated with HPV infection. In a Brazilian study, homozygous Pro genotype appears to be a protective factor for the acquisition of HPV infection in Human Immunodeficiency Virus (HIV) positive women (Entiauspe, Seixas et al. 2014). Regarding the development of cervical cancer, it was observed that HPV positive women with the Arg/Arg genotype and Arg carriers have a higher risk of developing this type of cancer compared to the control group (Isakova, Vinnikov et al. 2019).

Correlation analyzes were also performed between the genotypic and allelic distribution of the Arg72Pro polymorphism and the clinicopathological parameters of BC patients. In general BC, it was observed that patients carrying the Pro allele had a higher histopathological grade compared to patients with the Arg/Arg genotype (Tau-b = 0.162;  $p = 0.016$ ). As mentioned earlier, the Pro allele has a lower potential for apoptosis and the presence of the allele encoding this amino acid in homozygosis can be considered more oncogenic than the presence of the Arg allele encoding in homozygosis (van Heemst, Mooijaart et al. 2005).

Evidence was found that somatic mutations in the *TP53* has longer half-life of the p53 protein, which accumulates in cell nucleus and are evident in immunostaining. Therefore, analysis of p53 expression through IHC p53 has been used as an indirect marker of somatic mutation in *TP53*, which was associated with poor prognosis and treatment failure in BC (Elledge, Clark et al. 1994, Yamashita, Nishio et al. 2004, Kobayashi, Iwaya et al. 2013, Banin Hirata, Oda et al. 2014). By analyzing the MMTV-like *env* negative samples, we were able to observe that in BC patients who carry the Pro allele they were mostly negative for the p53 expression compared to Arg/Arg patients (Tau-b = -0.166;  $p = 0.032$ ). Langerød, Bukholm et al. (2002) evaluated the combination of the somatic mutation in p53 and the *TP53* polymorphism alleles in 390 BC samples and observed that the occurrence of the somatic mutation in p53 was more frequent in patients carrying the Arg allele compared to those carrying the Pro allele. These results suggest a growth advantage

for cells carrying a p53 somatic mutation when the mutation resides on an Arg72 allele, which may increase the risk of malignant transformation and development of cancer. Interestingly, although not significant, we could observe that Arg/Arg and Arg/Pro patients had tumors with higher staging compared to Pro/Pro patients. The relationship between the Arg72Pro polymorphism genotypes and the presence of somatic mutations in the *TP53* have been explored in other types of cancer, such as non-small cell lung cancer (Lind, Ekstrøm et al. 2007), oral squamous cell carcinomas (Hsieh, Huang et al. 2005) and transitional cell carcinomas (Furihata, Takeuchi et al. 2002), all demonstrating the presence of somatic mutation in p53 in patients carrying the Arg allele.

Also, in this same group of patients, a significant correlation with age at diagnosis was observed, with Arg/Arg and Arg/Pro patients being younger compared to patients with the Pro allele in homozygosis. The association between age at diagnosis and Arg72Pro polymorphism in *TP53* gene has been explored in the literature and no significant results were observed in patients with BC (Damin, Frazzon et al. 2006, Costa, Pinto et al. 2008). However, studies evaluating patients with glioblastoma (El Hallani, Ducray et al. 2009), oral cancer (Shen, Zheng et al. 2002) and lung cancer (Jin, Wu et al. 1995, Murata, Tagawa et al. 1998) have shown an association between the Pro/Pro genotype and early age in tumor development, this can be explained by the decrease in apoptosis and higher rate of somatic mutation in the tumor of Pro/Pro patients (El Hallani, Ducray et al. 2009).

A trend was also observed in positive MMTV-like *env* patients, in which we observed a greater remission in patients carrying the Pro allele. Studies have shown that cancer patients who have the Pro allele have longer survival compared to the Arg/Arg genotype (van Heemst, Mooijaart et al. 2005, Ørsted, Bojesen et al. 2007). However, a study carried out by Kodal, Vedel-Krogh et al. (2017), in which 105,200 individuals were genotyped and followed for a period of 10 years, an absence of association between the Arg72Pro polymorphism genotypes with cancer mortality or cancer incidence was observed.

The present work investigated the distribution of genotypes of the polymorphism Arg72Pro in *TP53* gene in BC patients and cancer-free controls in the Brazilian population and we verified an association of the Pro/Pro genotype with disease protection. Also, no association was found between *TP53* genotypes and the presence or absence of MMTV-like *env* gene, being the first work to seek such

association. Despite this, we can observe that patients carrying the Pro allele had significant correlation with clinicopathological characteristics, such as higher histopathological grade and older age at diagnosis. However, in general BC, carriers of the Pro allele who lack the MMTV like gene correlated negatively with the p53 expression. In MMTV-like *env* positive samples, the same Pro allele, although not significant, was correlated with a greater remission of these patients. Considering all these results, further studies should be performed in the Brazilian population with BC to clarify the involvement of the Arg72Pro in *TP53* gene polymorphism and the expression of p53 protein in MMTV-like *env* positive and negative tumors.

### **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).

**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**

- 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.
- Aoki, M. N., A. C. da Silva do Amaral Herrera, M. K. Amarante, J. L. do Val Carneiro, M. H. Fungaro and M. A. Watanabe (2009). "CCR5 and p53 codon 72 gene polymorphisms: implications in breast cancer development." Int J Mol Med **23**(3): 429-435.
- Ayoubi, S. E., M. Elkarroumi, M. El Khachibi, H. Hassani Idrissi, H. Ayoubi, S. Ennachit, M. Arazzakou and S. Nadifi (2018). "The 72Pro Variant of the Tumor Protein 53 Is Associated with an Increased Breast Cancer Risk in the Moroccan Population." Pathobiology **85**(4): 247-253.
- Banin Hirata, B. K., J. M. Oda, R. Losi Guembarovski, C. B. Ariza, C. E. de Oliveira and M. A. Watanabe (2014). "Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior." Dis Markers **2014**: 513158.
- Bergamaschi, D., Y. Samuels, A. Sullivan, M. Zvelebil, H. Breysens, A. Bisso, G.

- Del Sal, N. Syed, P. Smith and M. J. N. g. Gasco (2006). "iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53." *38*(10): 1133-1141.
- Bieging, K. T., S. S. Mello and L. D. Attardi (2014). "Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression." *Nat Rev Cancer* **14**(5): 359-370.
- Bittner, J. J. (1936). "Some Possible Effects of Nursing on the Mammary Gland Tumor Incidence in Mice." *Science* **84**(2172): 162.
- Brierley, J., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours*. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd.
- Costa, S., D. Pinto, D. Pereira, H. Rodrigues, J. Cameselle-Teijeiro, R. Medeiros and F. Schmitt (2008). "Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer." *BMC Cancer* **8**(1): 32.
- Damin, A. P. S., A. P. G. Frazzon, D. C. Damin, A. Roehe, V. Hermes, C. Zettler and C. O. P. Alexandre (2006). "Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk." *Cancer Detection and Prevention* **30**(6): 523-529.
- de Sousa Pereira, N., G. Akelington Freire Vitiello, B. Karina Banin-Hirata, G. Scantamburlo Alves Fernandes, M. José Sparça Salles, M. Karine Amarante and M. Angelica Ehara Watanabe (2020). "Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-Like env Sequence in Brazilian Breast Cancer Samples: Implications in Clinicopathological Parameters in Molecular Subtypes." *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**(24): 9496.
- Dumont, P., J.-J. Leu, A. C. Della Pietra, D. L. George and M. J. N. g. Murphy (2003). "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." *33*(3): 357-365.
- Dumont, P., J. I. Leu, A. C. Della Pietra, 3rd, D. L. George and M. Murphy (2003). "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." *Nat Genet* **33**(3): 357-365.
- El Hallani, S., F. Ducray, A. Idbaih, Y. Marie, B. Boisselier, C. Colin, F. Laigle-Donadey, M. Rodéro, O. Chinot, J. Thillet, K. Hoang-Xuan, J. Y. Delattre and M. Sanson (2009). "TP53 codon 72 polymorphism is associated with age at onset of glioblastoma." *Neurology* **72**(4): 332-336.
- Elledge, R. M., G. M. Clark, S. A. Fuqua, Y. Y. Yu and D. C. Allred (1994). "p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer." *Cancer Res* **54**(14): 3752-3757.
- Entiauspe, L. G., F. K. Seixas, E. M. Nunes, F. M. Rodrigues, O. A. Dellagostin, T. Collares and M. F. da Silveira (2014). "Uncommon non-oncogenic HPV genotypes, TP53 and MDM2 genes polymorphisms in HIV-infected women in Southern Brazil." *Braz J Infect Dis* **18**(6): 643-650.
- 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.
- Furihata, M., T. Takeuchi, M. Matsumoto, A. Kurabayashi, Y. Ohtsuki, N. Terao, M. Kuwahara and T. Shuin (2002). "p53 Mutation Arising in Arg72 Allele in the Tumorigenesis and Development of Carcinoma of the Urinary Tract." *Clinical Cancer Research* **8**(5): 1192-1195.
- Goldhirsch, A., J. N. Ingle, R. D. Gelber, A. S. Coates, B. Thürlimann and H. J. Senn (2009). "Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert

- Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009." Ann Oncol **20**(8): 1319-1329.
- 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.
- Hacke, K., B. Rincon-Orozco, G. Buchwalter, S. Y. Siehler, B. Wasylyk, L. Wiesmüller and F. Rösl (2010). "Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53." Molecular Cancer **9**(1): 82.
- 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.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hashimoto, N., H. Nagano and T. J. E. J. Tanaka (2019). "The role of tumor suppressor p53 in metabolism and energy regulation, and its implication in cancer and lifestyle-related diseases." EJ18-0565.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein and C. C. Harris (1991). "p53 mutations in human cancers." Science **253**(5015): 49-53.
- Hsieh, L. L., T. H. Huang, I. H. Chen, C. T. Liao, H. M. Wang, C. H. Lai, S. H. Liou, J. T. Chang and A. J. Cheng (2005). "p53 polymorphisms associated with mutations in and loss of heterozygosity of the p53 gene in male oral squamous cell carcinomas in Taiwan." Br J Cancer **92**(1): 30-35.
- Isakova, J., D. Vinnikov, N. Bukuev, E. Talaibekova and N. Aldasheva (2019). "TP53 Codon 72 Polymorphism and Human Papilloma Virus-Associated Cervical Cancer in Kyrgyz Women." Asian Pac J Cancer Prev **20**(4): 1057-1062.
- Jin, X., X. Wu, J. A. Roth, C. I. Amos, T. M. King, C. Branch, S. E. Honn and M. R. Spitz (1995). "Higher lung cancer risk for younger African-Americans with the Pro/Pro p53 genotype." Carcinogenesis **16**(9): 2205-2208.
- Kirby, L. T. (1990). DNA Fingerprint. Londres, Palgrave Macmillan UK.
- Kobayashi, T., K. Iwaya, T. Moriya, T. Yamasaki, H. Tsuda, J. Yamamoto and O. Matsubara (2013). "A simple immunohistochemical panel comprising 2 conventional markers, Ki67 and p53, is a powerful tool for predicting patient outcome in luminal-type breast cancer." BMC Clin Pathol **13**: 5.
- Kodal, J. B., S. Vedel-Krogh, C. J. Kobylecki, B. G. Nordestgaard and S. E. Bojesen (2017). "TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals." Scientific reports **7**(1): 336-336.
- Langerød, A., I. R. K. Bukholm, A. Bregård, P. E. Lønning, T. I. Andersen, T. O. Rognum, G. I. Meling, R. A. Lothe and A.-L. Børresen-Dale (2002). "The TP53 Codon 72 Polymorphism May Affect the Function of TP53 Mutations in Breast Carcinomas but not in Colorectal Carcinomas." Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention **11**(12): 1684-1688.
- Lawson, J. S. and W. K. Glenn (2019). "Evidence for a causal role by mouse

- mammary tumour-like virus in human breast cancer." npj Breast Cancer **5**(1): 40.
- Lawson, J. S., D. D. Tran, C. Ford and W. D. Rawlinson (2004). "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 **87**(1): 13-17.
- Lind, H., P. O. Ekstrøm, D. Ryberg, V. Skaug, T. Andreassen, L. Stangeland, A. Haugen and S. Zienolddiny (2007). "Frequency of TP53 mutations in relation to Arg72Pro genotypes in non small cell lung cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(10): 2077-2081.
- Liu, B., Y. Wang, S. M. Melana, I. Pelisson, V. Najfeld, J. F. Holland and B. G. Pogo (2001). "Identification of a proviral structure in human breast cancer." Cancer Res **61**(4): 1754-1759.
- Matlashewski, G., S. Tuck, D. Pim, P. Lamb, J. Schneider, L. J. M. Crawford and C. Biology (1987). "Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53." **7**(2): 961-963.
- Mok, M. T. S., J. S. Lawson, B. J. Iacopetta and N. J. Whitaker (2008). "Mouse mammary tumor virus-like env sequences in human breast cancer." International Journal of Cancer **122**(12): 2864-2870.
- Murata, M., M. Tagawa, H. Kimura, K. Kakisawa, H. Shirasawa and T. Fujisawa (1998). "Correlation of the mutation of p53 gene and the polymorphism at codon 72 in smoking-related non-small cell lung cancer patients." Int J Oncol **12**(3): 577-658.
- Murphy, M. E. (2006). "Polymorphic variants in the p53 pathway." Cell Death & Differentiation **13**(6): 916-920.
- Ørsted, D. D., S. E. Bojesen, A. Tybjaerg-Hansen and B. G. Nordestgaard (2007). "Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population." J Exp Med **204**(6): 1295-1301.
- Papadakis, E. N., D. N. Dokianakis and D. A. Spandidos (2000). "p53 codon 72 polymorphism as a risk factor in the development of breast cancer." Mol Cell Biol Res Commun **3**(6): 389-392.
- Pim, D. and L. J. I. j. o. c. Banks (2004). "p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression." **108**(2): 196-199.
- Pogo, B. G., S. M. Melana, J. F. Holland, J. F. Mandeli, S. Pilotti, P. Casalini and S. Menard (1999). "Sequences homologous to the mouse mammary tumor virus env gene in human breast carcinoma correlate with overexpression of laminin receptor." Clin Cancer Res **5**(8): 2108-2111.
- Proestling, K., A. Hebar, N. Pruckner, E. Marton, U. Vinatzer and M. Schreiber (2012). "The Pro Allele of the p53 Codon 72 Polymorphism Is Associated with Decreased Intratumoral Expression of BAX and p21, and Increased Breast Cancer Risk." PLOS ONE **7**(10): e47325.
- Rivas, C., S. A. Aaronson and C. Munoz-Fontela (2010). "Dual Role of p53 in Innate Antiviral Immunity." Viruses **2**(1): 298-313.
- Shen, H., Y. Zheng, E. M. Sturgis, M. R. Spitz and Q. Wei (2002). "P53 codon 72 polymorphism and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study." Cancer Lett **183**(2): 123-130.
- Siddique, M. and K. J. O. Sabapathy (2006). "Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism." **25**(25): 3489-3500.
- Taura, M., A. Eguma, M. A. Suico, T. Shuto, T. Koga, K. Komatsu, T. Komune, T. Sato, H. Saya, J.-D. Li and H. Kai (2008). "p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines." Molecular and cellular biology **28**(21): 6557-6567.

Thomas, M., A. Kalita, S. Labrecque, D. Pim, L. Banks and G. Matlashewski (1999). "Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically." Mol Cell Biol **19**(2): 1092-1100.

Thomas, M., A. Kalita, S. Labrecque, D. Pim, L. Banks, G. J. M. Matlashewski and c. biology (1999). "Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically." **19**(2): 1092-1100.

van Heemst, D., S. P. Mooijaart, M. Beekman, J. Schreuder, A. J. de Craen, B. W. Brandt, P. E. Slagboom and R. G. Westendorp (2005). "Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality." Exp Gerontol **40**(1-2): 11-15.

van Heemst, D., S. P. Mooijaart, M. Beekman, J. Schreuder, A. J. de Craen, B. W. Brandt, P. E. Slagboom and R. G. J. E. g. Westendorp (2005). "Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality." **40**(1-2): 11-15.

van Heemst, D., S. P. Mooijaart, M. Beekman, J. Schreuder, A. J. M. de Craen, B. W. Brandt, P. Eline Slagboom and R. G. J. Westendorp (2005). "Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality1." Experimental Gerontology **40**(1): 11-15.

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.

Xia, L. Y., X. T. Zeng, C. Li, W. D. Leng and M. W. Fan (2013). "Association between p53 Arg72Pro polymorphism and the risk of human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis." Asian Pac J Cancer Prev **14**(10): 6127-6130.

Yamashita, H., M. Nishio, T. Toyama, H. Sugiura, Z. Zhang, S. Kobayashi and H. Iwase (2004). "Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer." Breast Cancer Res **6**(1): R24-30.

## 4 CONCLUSÃO

### Artigo 1

- Neste estudo, podemos verificar a associação entre estressores crônicos da vida prévio ao diagnóstico de CM com estado civil e positividade para RE, demonstrando o panorama social e clínico-patológico das pacientes atendidas no HCL, Paraná, Brasil.

### Artigo 2

- Este estudo demonstra que não há associação entre os genótipos WT/Del de *APOBEC3* e a presença do gene *env* do MMTV-*like* em pacientes com diagnóstico de CM, sendo o primeiro estudo que busca essa associação.

### Artigo 3

- Observamos que os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  foram menores em amostras de pacientes com CM em comparação ao grupo controle.
- Quanto ao seu papel no CM MMTV-*like* positivo, não está claro se os níveis aumentados de IFN- $\gamma$  estão refletindo uma possível resposta imune contra o vírus ou se a citocina está contribuindo para o crescimento de células malignas. Portanto, mais estudos devem ser realizados para explorar a relação da sinalização de IFN no microambiente tumoral MMTV-*like* positivo.

### Artigo 4

- Verificamos que, no estudo caso-controle, o genótipo Pro/Pro do polimorfismo rs1042522 Arg72Pro do *TP53* gera proteção para o desenvolvimento do CM e ausência de associação entre os genótipos com a presença do gene *env* do MMTV-*like*, sendo o primeiro trabalho a avaliar tal associação.
- Outros estudos devem ser realizados para verificar as correlações dos genótipos com os parâmetros clínico patológicos estudados nesse trabalho, visto que resultados do polimorfismo rs1042522 Arg72Pro do *TP53* são controversos em diversas populações.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou o envolvimento do estresse crônico, do vírus do tumor mamário humano (MMTV-*like*), de variações genéticas e da resposta imune antiviral como possíveis fatores associados ao desenvolvimento do CM.

Neste trabalho, podemos observar que o estresse crônico, muitas vezes ocasionado por mortes de pessoas muito próximas das mulheres, como cônjuge, pode ocasionar a desestabilização física e emocional. Essas alterações, somadas a outros fatores de risco que essas mulheres estão expostas, podem vir a auxiliar no desenvolvimento de uma neoplasia, como o próprio CM.

Já no contexto imunológico envolvendo a presença do MMTV-*like* no microambiente tumoral, podemos constatar o papel controverso do IFN- $\gamma$ . Apesar disso, os níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  foram menores em amostras de pacientes, sendo observado o mesmo nos subtipos moleculares Luminal-A, Luminal-B e triplo-negativo. Com relação ao envolvimento dos genótipos da deleção da *APOBEC3B* e do SNP rs1042522 Arg72Pro do *TP53* na presença do gene *env* do MMTV-*like* nas amostras de CM, não foi observada nenhuma associação, porém precisamos ressaltar que, até o presente momento, estes são trabalhos inéditos na literatura.

Assim, o presente trabalho indica o envolvimento de fatores estressores prévios ao diagnóstico do CM como possíveis fatores associados ao desenvolvimento da doença. Além disso, elementos da resposta imune antiviral, como a expressão proteica de IFN- $\gamma$  e polimorfismos genéticos em genes que codificam proteínas importantes dessa resposta, parecem não prejudicar e nem beneficiar a participação do MMTV-*like* na patogênese do CM. Tais resultados auxiliam na compreensão dos possíveis mecanismos necessários para atuação do MMTV-*like*, sendo necessário outros estudos para confirmar o envolvimento desse vírus no desenvolvimento de CM em humanos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHANGAR OSKOUEE, M. et al. No Evidence of Mammary Tumor Virus env Gene-Like Sequences among Iranian Women with Breast Cancer. **Intervirolgy**, 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> >.

AL HAMAD, M. et al. Human Mammary Tumor Virus, Human Papilloma Virus, and Epstein-Barr Virus Infection Are Associated With Sporadic Breast Cancer Metastasis. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 14, p. 1178223420976388, 2020. Disponível em: < <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1178223420976388> >.

ALEXANDROV, L. B. et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. **Nature**, v. 578, n. 7793, p. 94-101, 2020/02/01 2020. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3> >.

ALEXANDROV, L. B.; STRATTON, M. R. Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 24, p. 52-60, 2014. ISSN 0959437X.

ANTONOVA, L.; ARONSON, K.; MUELLER, C. R. Stress and breast cancer: from epidemiology to molecular biology. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 2, p. 208, Apr 21 2011. ISSN 1465-542X (Electronic) 1465-5411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575279> >.

ARNABOLDI, P. et al. PTSD symptoms as a consequence of breast cancer diagnosis: clinical implications. **SpringerPlus**, v. 3, p. 392-392, 2014. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25105089> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4124104/> >.

ASANO, K.; MERRICK, W. C.; HERSHEY, J. W. The translation initiation factor eIF3-p48 subunit is encoded by int-6, a site of frequent integration by the mouse mammary tumor virus genome. **J Biol Chem**, v. 272, n. 38, p. 23477-23480, Sep 19 1997. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 23, p. 5591-5596, Dec 1 2012. ISSN 0021-9533.

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> >.

BARRACLOUGH, J. et al. Life events and breast cancer prognosis. **BMJ**, v. 307, n. 6899, p. 325, Jul 31 1993. ISSN 0959-8138 (Print) 0959-8138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8374399> >.

BEATTY, G.; PATERSON, Y. IFN-gamma-dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor-infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN-gamma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 4, p. 2276-2282, Feb 15 2001. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

BERGAMASCHI, D. et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53. v. 38, n. 10, p. 1133-1141, 2006. ISSN 1546-1718.

BERNABEI, P. et al. Interferon-gamma receptor 2 expression as the deciding factor in human T, B, and myeloid cell proliferation or death. **J Leukoc Biol**, v. 70, n. 6, p. 950-960, Dec 2001. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359-370, May 2014. ISSN 1474-175X (Print) 1474-175x.

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<sup>a</sup> edition. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2017.

BURNS, M. B. et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. **Nature**, v. 494, n. 7437, p. 366-370, 2013. ISSN 0028-0836 1476-4687.

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, 2013/09/01 2013. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/ng.2701> >.

CALLAHAN, R. et al. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 18, p. 5503-5507, 1982. Disponível em: < <https://www.pnas.org/content/pnas/79/18/5503.full.pdf> >.

CALLAHAN, R.; SMITH, G. H. MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. **Oncogene**, v. 19, n. 8, p. 992-1001, 2000/02/01 2000. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203276> >.

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> >.

CESCON, D. W.; HAIBE-KAINS, B.; MAK, T. W. APOBEC3B expression in breast cancer reflects cellular proliferation, while a deletion polymorphism is associated with immune activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 9, p. 2841-2846, Mar 3 2015. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

CHAN, K. et al. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. **Nat Genet**, v. 47, n. 9, p. 1067-1072, 2015/09/01 2015. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/ng.3378> >.

CHAWLA-SARKAR, M. et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 3, p. 237-249, Jun 2003. ISSN 1360-8185 (Print) 1360-8185.

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, 2009. ISSN 0027-8874 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684553/> >.

CHIN, Y. E. et al. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. **Science**, v. 272, n. 5262, p. 719-722,

May 3 1996. ISSN 0036-8075 (Print)  
0036-8075.

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

COLLOT-TEIXEIRA, S. et al. Human tumor suppressor p53 and DNA viruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 14, n. 5, p. 301-319, 2004. ISSN 1052-9276. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.431> >.

CORTEZ, L. M. et al. APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 12, p. e1008545, 2019. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008545> >.

COUGHLIN, C. M. et al. Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 25-34, Jul 1998. ISSN 1074-7613 (Print)  
1074-7613.

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

DE BRABANDER, B.; GERITS, P. Chronic and acute stress as predictors of relapse in primary breast cancer patients. **Patient Educ Couns**, v. 37, n. 3, p. 265-272, Jul 1999. ISSN 0738-3991 (Print)  
0738-3991.

DE SOUSA PEREIRA, N. et al. Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)-Like env Sequence in Brazilian Breast Cancer Samples: Implications in Clinicopathological Parameters in Molecular Subtypes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 24, p. 9496, 2020. ISSN 1660-4601. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/24/9496> >.

DIÉVART, A.; BEAULIEU, N.; JOLICOEUR, P. Involvement of Notch1 in the development of mouse mammary tumors. **Oncogene**, v. 18, n. 44, p. 5973-5981, 1999/10/01 1999. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202991> >.

DIGHE, A. S. et al. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN  $\gamma$  receptors. **Immunity**, v. 1, n. 6, p. 447-456, Sep 1994. ISSN 1074-7613 (Print)  
1074-7613.

DONNELLY, R. P.; KOTENKO, S. V. Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 30, n. 8, p. 555-564, 2010. Disponível em: < <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jir.2010.0078> >.

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> >.

DUIJTS, S. F.; ZEEGERS, M. P.; BORNE, B. V. The association between stressful life events and breast cancer risk: a meta-analysis. **Int J Cancer**, v. 107, n. 6, p. 1023-1029, Dec 20 2003. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136.

DUMONT, P. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. v. 33, n. 3, p. 357-365, 2003. ISSN 1546-1718.

ELINAV, E. et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nat Rev Cancer**, v. 13, n. 11, p. 759-771, Nov 2013. ISSN 1474-175x.

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> >.

FALLAH, R. et al. Incidence and Survival in Breast Cancer Patients and Stressful Life Events. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. S3, p. 245-252, 2016. ISSN 1513-7368.

FARRAR, M. A.; FERNANDEZ-LUNA, J.; SCHREIBER, R. D. Identification of two regions within the cytoplasmic domain of the human interferon-gamma receptor required for function. **J Biol Chem**, v. 266, n. 29, p. 19626-19635, Oct 15 1991. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

FERNANDEZ-COBO, M. et al. Transcription profile of a human breast cancer cell

line expressing MMTV-like sequences. **Infectious Agents and Cancer**, v. 1, n. 1, p. 7, December 15 2006. ISSN 1750-9378. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1750-9378-1-7> >.

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.

FISCHER, T. et al. Human chromosome 21 is necessary and sufficient to confer human IFN gamma responsiveness to somatic cell hybrids expressing the cloned human IFN gamma receptor gene. **Cytokine**, v. 2, n. 3, p. 157-161, May 1990. ISSN 1043-4666 (Print) 1043-4666.

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> >.

FORSÉN, A. Psychosocial stress as a risk for breast cancer. **Psychother Psychosom**, v. 55, n. 2-4, p. 176-185, 1991. ISSN 0033-3190 (Print) 0033-3190.

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> >.

GAGLIA, M. M.; MUNGER, K. More than just oncogenes: mechanisms of tumorigenesis by human viruses. **Curr Opin Virol**, v. 32, p. 48-59, Oct 2018. ISSN 1879-6257 (Print) 1879-6257.

GARBE, C. et al. Antitumor activities of interferon alpha, beta, and gamma and their combinations on human melanoma cells in vitro: changes of proliferation, melanin synthesis, and immunophenotype. **J Invest Dermatol**, v. 95, n. 6 Suppl, p. 231s-237s, Dec 1990. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202x.

GRAHAM, J. et al. Stressful life experiences and risk of relapse of breast cancer: observational cohort study. **BMJ**, v. 324, n. 7351, p. 1420, Jun 15 2002. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-8138 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065263> >.

GRANDI, N.; PISANO, M. P.; TRAMONTANO, E. The emerging field of human endogenous retroviruses: understanding their physiological role and contribution to diseases. **Future Virology**, v. 14, n. 7, p. 441-444, 2019. Disponível em: < <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/fvl-2019-0061> >.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, Mar 19 2010. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

GUPTA, I. et al. Presence of high-risk HPVs, EBV, and MMTV in human triple-negative breast cancer. p. 1-10, Oct 8 2021. ISSN 2164-5515.

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.

HACKE, K. et al. Regulation of MCP-1 chemokine transcription by p53. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 82, 2010/04/20 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-82> >.

HANAHAN, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022. ISSN 2159-8274. Disponível em: < <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059> >. Acesso em: 3/2/2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

\_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674.

HARRIS, R.; BURNS, M.; LEONARD, B. APOBEC3B: Pathological consequences of an innate immune DNA mutator. **Biomedical Journal**, v. 38, n. 2, p. 102, 2015. ISSN 2319-4170.

HASHIMOTO, N.; NAGANO, H.; TANAKA, T. J. E. J. The role of tumor suppressor p53 in metabolism and energy regulation, and its implication in cancer and lifestyle-related diseases. p. EJ18-0565, 2019. ISSN 0918-8959.

HAYASHI, K. et al. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) DNA and immune complex (HSV-1-human IgG) elicit vigorous interleukin 6 release from infected corneal cells via Toll-like receptors. **J Gen Virol**, v. 87, n. Pt 8, p. 2161-2169, Aug 2006. ISSN 0022-1317 (Print)  
0022-1317 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847112> >.

HEIMES, A.-S. et al. Prognostic Significance of Interferon- $\gamma$  and Its Signaling Pathway in Early Breast Cancer Depends on the Molecular Subtypes. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 19, p. 7178, 2020. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/19/7178> >.

HEMMI, S. et al. Cloning of murine interferon gamma receptor cDNA: expression in human cells mediates high-affinity binding but is not sufficient to confer sensitivity to murine interferon gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 24, p. 9901-9905, Dec 1989. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424.

HENDERSON, S. et al. APOBEC-Mediated Cytosine Deamination Links PIK3CA Helical Domain Mutations to Human Papillomavirus-Driven Tumor Development. **Cell Reports**, v. 7, n. 6, p. 1833-1841, 2014. ISSN 2211-1247. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.012> >. Acesso em: 2021/04/22.

HENDERSON, S.; FENTON, T. APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer drivers. **Trends Mol Med**, v. 21, n. 5, p. 274-284, May 2015. ISSN 1471-4914.

HOBEIKA, A. C. et al. IFN-gamma induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis. **J Interferon Cytokine Res**, v. 19, n. 12, p. 1351-1361, Dec 1999. ISSN 1079-9907 (Print)  
1079-9907.

HOCHREIN, H. et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 31, p. 11416-11421, Aug 3 2004. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15272082> >.

HOLLSTEIN, M. et al. Base changes in tumour DNA have the power to reveal the causes and evolution of cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 2, p. 158-167, 2016. ISSN 0950-9232  
1476-5594.

HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 49-53, Jul 5 1991. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

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> >.

HOSSAIN, A. et al. TP53 codon 72 polymorphism and breast cancer risk in Bangladeshi population. **Breast Cancer**, v. 24, n. 4, p. 571-578, 2017/07/01 2017. ISSN 1880-4233. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0740-1> >.

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 2020: incidência de câncer no Brasil**. SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Rio de Janeiro 2019.

ISOBE, M. et al. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. v. 320, n. 6057, p. 84-85, 1986. ISSN 1476-4687.

JACOBS, J. R.; BOVASSO, G. B. Early and chronic stress and their relation to breast cancer. **Psychol Med**, v. 30, n. 3, p. 669-678, May 2000. ISSN 0033-2917 (Print) 0033-2917.

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> >.

JOHANSEN, C.; OLSEN, J. H. Psychological stress, cancer incidence and mortality from non-malignant diseases. **British Journal of Cancer**, v. 75, n. 1, p. 144-148, 1997. ISSN 0007-0920 1532-1827. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9000613> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2222697/> >.

JONKERS, J.; BERNS, 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/> >.

KAPLAN, D. H. et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 13, p. 7556-7561, Jun 23 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

KHALID, H. F. et al. MMTV-LIKE virus and c-myc over-expression are associated with invasive breast cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 91, p. 104827, 2021/07/01/ 2021. ISSN 1567-1348. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134821001246> >.

KIETHHUBTHEW, S. et al. The p53 codon 72 polymorphism and risk of oral cancer in Southern Thailand. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 4, n. 3, p. 209-214, Jul-Sep 2003. ISSN 1513-7368 (Print) 1513-7368 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14507241> >.

KLONOWSKA, K. et al. The 30 kb deletion in the APOBEC3 cluster decreases APOBEC3A and APOBEC3B expression and creates a transcriptionally active hybrid gene but does not associate with breast cancer in the European population. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.oncotarget.com/article/19400/text/> >.

KRUK, J.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Psychological stress and the risk of breast cancer: a case-control study. **Cancer Detect Prev**, v. 28, n. 6, p. 399-408, 2004. ISSN 0361-090X (Print) 0361-090X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582263> >.

KVIKSTAD, A.; VATTEN, L. J. Risk and prognosis of cancer in middle-aged women who have experienced the death of a child. **Int J Cancer**, v. 67, n. 2, p. 165-169, Jul 17 1996. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136.

LAW, E. K. et al. The DNA cytosine deaminase APOBEC3B promotes tamoxifen resistance in ER-positive breast cancer. **Science Advances**, v. 2, n. 10, p. e1601737-e1601737, 2016. ISSN 2375-2548.

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.; SALMONS, B.; GLENN, W. K. Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein-Barr Virus (EBV). **Front Oncol**, v. 8, p. 1, 2018. ISSN 2234-943X (Print)

2234-943X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404275> >.

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> >.

LEE, F. S. et al. Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fgf-3 transgenic mice.

**Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 6, p. 2268-2272, 1995. ISSN 0027-8424

1091-6490. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7892260>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC42465/> >.

LEFEBVRE, C. et al. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. **PLOS Medicine**, v. 13, n. 12, p. e1002201, 2016.

Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002201> >.

LESSI, F. et al. A human MMTV-like betaretrovirus linked to breast cancer has been present in humans at least since the copper age. **Aging**, v. 12, n. 16, p. 15978-15994,

2020. ISSN 1945-4589. Disponível em: <

<https://doi.org/10.18632/aging.103780> >.

LEVAV, I. et al. Cancer incidence and survival following bereavement. **Am J Public Health**, v. 90, n. 10, p. 1601-1607, Oct 2000. ISSN 0090-0036 (Print)

0090-0036.

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, J. et al. Cancer incidence in parents who lost a child: a nationwide study in Denmark. **Cancer**, v. 95, n. 10, p. 2237-2242, Nov 15 2002. ISSN 0008-543X (Print)

0008-543x.

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> >.

LILLBERG, K. et al. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 5, p. 415-423, Mar 1 2003. ISSN 0002-9262 (Print) 0002-9262.

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> >.

LIU, Y. et al. Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. v. 28, n. 14, p. 2467, 2010.

LOLLINI, P. L. et al. Inhibition of tumor growth and enhancement of metastasis after transfection of the gamma-interferon gene. **Int J Cancer**, v. 55, n. 2, p. 320-329, Sep 9 1993. ISSN 0020-7136 (Print) 0020-7136.

LOUTFY, S. A. et al. Prevalence of MMTV-Like env Sequences and Its Association with BRCA1/2 Genes Mutations Among Egyptian Breast Cancer Patients. **Cancer Manag Res**, v. 13, p. 2835-2848, 2021. ISSN 1179-1322 (Print) 1179-1322.

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> >.

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> >.

MARINO, D. et al. APOBEC4 Enhances the Replication of HIV-1. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0155422, 2016. Disponível em: <  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155422> >.

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.

MATLASHEWSKI, G. et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. v. 7, n. 2, p. 961-963, 1987. ISSN 0270-7306.

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](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. 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> >.

METWALLY, S. A. et al. Presence of HPV, EBV and HMTV Viruses Among Egyptian Breast Cancer Women: Molecular Detection and Clinical Relevance. **Infect Drug Resist**, v. 14, 2021.

MILLER, C. H.; MAHER, S. G.; YOUNG, H. A. Clinical Use of Interferon-gamma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1182, p. 69-79, Dec 2009. ISSN 0077-8923 (Print)  
 0077-8923.

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.

MOORE, P. S.; CHANG, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 12, p. 878-889, Dec 2010. ISSN 1474-175X (Print)  
 1474-175x.

MORALES-SÁNCHEZ, A.; FUENTES-PANANÁ, E. M. Human viruses and cancer. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 4047-4079, 2014. ISSN 1999-4915. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25341666>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4213577/> >.

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> >.

MUÑOZ-FONTELA, C. et al. Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity. **J Exp Med**, v. 205, n. 8, p. 1929-1938, Aug 4 2008. ISSN 0022-1007 (Print)  
 0022-1007.

NACCARATO, A. G. et al. Mouse mammary tumor virus (MMTV) - like exogenous sequences are associated with sporadic but not hereditary human breast carcinoma. **Aging**, v. 11, n. 17, p. 7236-7241, 2019. ISSN 1945-4589. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31518337>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6756874/> >.

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> >.

NIK-ZAINAL, S. et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. **Nat Genet**, v. 46, n. 5, p. 487-491, 2014/05/01 2014. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/ng.2955> >.

NILSSON, S. et al. Mechanisms of estrogen action. **Physiol Rev**, v. 81, n. 4, p. 1535-1565, Oct 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333.

NIU, X. L. et al. Autocrine interferon- $\gamma$  may affect malignant behavior and sensitivity to tamoxifen of MCF-7 via estrogen receptor  $\beta$  subtype. **Oncol Rep**, v. 34, n. 6, p. 3120-3130, Dec 2015. ISSN 1021-335x.

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> >.

OKUYAMA, S. et al. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme

catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. **International Journal of Cancer**, v. 130, n. 6, p. 1294-1301, 2012. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.26114> >.

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> >.

PETERS, G. et al. The mouse homolog of the hst/k-FGF gene is adjacent to int-2 and is activated by proviral insertion in some virally induced mammary tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 15, p. 5678-5682, 1989. ISSN 0027-8424 1091-6490. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2548184> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC297693/> >.

PETTERSSON, K.; DELAUNAY, F.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. **Oncogene**, v. 19, n. 43, p. 4970-4978, Oct 12 2000. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

PETTICREW, M.; FRASER, J. M.; REGAN, M. F. Adverse life-events and risk of breast cancer: A meta-analysis. **British Journal of Health Psychology**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 1999. ISSN 1359-107X. Disponível em: < <https://bpspsychub.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1348/135910799168434> >.

PIM, D.; BANKS, L. J. I. J. O. C. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. v. 108, n. 2, p. 196-199, 2004. ISSN 0020-7136.

PLATANIAS, L. C. et al. CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. **Exp Hematol**, v. 27, n. 8, p. 1315-1321, Aug 1999. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472x.

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/>>.

REBHANDL, S. et al. AID/APOBEC deaminases and cancer. **Oncoscience**, v. 2, p. 320, 2015. ISSN 2331-4737.

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

RIVAS, C.; AARONSON, S. A.; MUNOZ-FONTELA, C. Dual Role of p53 in Innate Antiviral Immunity. **Viruses**, v. 2, n. 1, p. 298-313, 2010. ISSN 1999-4915. Disponível em: <  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21994612>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185551/>>.

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/>>.

RÜEGG, C. et al. Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. **Nat Med**, v. 4, n. 4, p. 408-414, Apr 1998. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956.

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> >.

SANTOS, M. C. et al. Association between stress and breast cancer in women: a meta-analysis. **Cad Saude Publica**, v. 25 Suppl 3, p. S453-463, 2009. ISSN 0102-311x.

SATO, A.; LINEHAN, M. M.; IWASAKI, A. Dual recognition of herpes simplex viruses by TLR2 and TLR9 in dendritic cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 46, p. 17343-17348, Nov 14 2006. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085599> >.

SCHELHAAS, M. Viruses and cancer: molecular relations and perspectives. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 8, p. 815-816, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0176> >.

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> >.

SELIGER, B.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. **Adv Cancer Res**, v. 101, p. 249-276, 2008. ISSN 0065-230X (Print) 0065-230X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19055946> >.

SEN, G. C. Viruses and Interferons. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 255+, 2001 Annual // 2001. ISSN 00664227. Disponível em: < <https://link.gale.com/apps/doc/A80616399/AONE?u=anon~e6f21177&sid=googleScholar&xid=31fecf14> >. Acesso em: 2021/11/3/.

SEO, I. et al. Clinical and Prognostic Value of Human Mammary Tumor Virus in Korean Patients with Breast Carcinoma. **Ann Clin Lab Sci**, v. 49, n. 2, p. 171-174, Mar 2019. ISSN 0091-7370.

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> >.

SIDDIQUE, M.; SABAPATHY, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. **Oncogene**, v. 25, n. 25, p. 3489-3500, 2006/06/01 2006. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209405> >.

SIDDIQUE, M.; SABAPATHY, K. J. O. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. v. 25, n. 25, p. 3489-3500, 2006. ISSN 1476-5594.

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> >.

SIEUWERTS, A. M. et al. Elevated APOBEC3B Correlates with Poor Outcomes for Estrogen-Receptor-Positive Breast Cancers. **Hormones and Cancer**, v. 5, n. 6, p. 405-413, 2014/12/01 2014. ISSN 1868-8500. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s12672-014-0196-8> >.

SKLIRIS, G. P. et al. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. **J Pathol**, v. 201, n. 2, p. 213-220, Oct 2003. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417.

SLANEY, C. Y. et al. The role of Type I interferons in immunoregulation of breast cancer metastasis to the bone. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 1, p. e22339-e22339, 2013. ISSN 2162-4011 2162-402X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23482870> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3583915/> >.

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> >.

SMITH, H. C. et al. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 23, n. 3, p. 258-268, 2012. ISSN 10849521.

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> >.

SPILL, F. et al. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. **Curr Opin Biotechnol**, v. 40, p. 41-48, Aug 2016. ISSN 0958-1669 (Print) 0958-1669.

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.

STEPHENS, M. A.; WAND, G. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. **Alcohol Res**, v. 34, n. 4, p. 468-483, 2012. ISSN 2168-3492 (Print)  
2168-3492.

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.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, Feb 4 2021. ISSN 1542-4863 (Electronic)  
0007-9235 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33538338> >.

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.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 75-86, Jan 2009. ISSN 1600-065X (Electronic)  
0105-2896 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120477> >.

TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. **Cancer Res**, v. 70, n. 14, p. 5649-5669, Jul 15 2010. ISSN 0008-5472 (Print)  
0008-5472.

TANIGUCHI, K. et al. Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 10, p. 3405-3409, May 1987. ISSN 0027-8424 (Print)  
0027-8424.

TAURA, M. et al. p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 21, p. 6557-6567, 2008. ISSN 1098-5549

0270-7306. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18779317>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2573237/> >.

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> >.

THOMAS, M. et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 2, p. 1092-1100, Feb 1999. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306.

THOMAS, M. et al. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. v. 19, n. 2, p. 1092-1100, 1999. ISSN 0270-7306.

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> >.

TSANG, J. Y. S.; TSE, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 27, n. 1, 2020. ISSN 1072-4109. Disponível em: < [https://journals.lww.com/anatomicpathology/Fulltext/2020/01000/Molecular\\_Classification\\_of\\_Breast\\_Cancer.5.aspx](https://journals.lww.com/anatomicpathology/Fulltext/2020/01000/Molecular_Classification_of_Breast_Cancer.5.aspx) >.

TSUBOI, M. et al. APOBEC3B high expression status is associated with aggressive phenotype in Japanese breast cancers. **Breast Cancer**, v. 23, n. 5, p. 780-788, 2015. ISSN 1340-6868 1880-4233.

VAJPEYI, R. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 6, p. 671-672, 2005. ISSN 0021-9746 1472-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770678/> >.

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.

VAN HEEMST, D. et al. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. v. 40, n. 1-2, p. 11-15, 2005. ISSN 0531-5565.

VAN HEEMST, D. et al. Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality1. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 1, p. 11-15, 2005/01/01/2005. ISSN 0531-5565. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556504003158> >.

VERHALEN, B. et al. Functional Upregulation of the DNA Cytosine Deaminase APOBEC3B by Polyomaviruses. **J Virol**, v. 90, n. 14, p. 6379-6386, 2016. ISSN 0022-538X  
1098-5514.

VERMA, R. S.; TRIANTAFILLOU, N. G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 100, n. 1, p. 88-90, Jan 1 1998. ISSN 0165-4608 (Print)  
0165-4608.

VITIELLO, G. A. F. et al. Germline APOBEC3B deletion influences clinicopathological parameters in luminal-A breast cancer: evidences from a southern Brazilian cohort. **J Cancer Res Clin Oncol**, 2020/04/13 2020. ISSN 1432-1335. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00432-020-03208-8> >.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. J. N. Surfing the p53 network. v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000. ISSN 1476-4687.

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, F.-L. et al. Prevalence and characteristics of mouse mammary tumor virus-like virus associated breast cancer in China. **Infectious Agents and Cancer**, v. 16, n. 1, p. 47, 2021/06/26 2021. ISSN 1750-9378. Disponível em: < <https://doi.org/10.1186/s13027-021-00383-2> >.

WANG, F. et al. Mouse mammary tumor virus-like virus infection and the risk of human breast cancer: a meta-analysis. **Am J Transl Res**, v. 6, n. 3, p. 248-266, 2014. ISSN 1943-8141 (Print)  
1943-8141.

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.** 2001. 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 2001. 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, 2001. 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> >.

WEBER, J. S.; ROSENBERG, S. A. Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. **Cancer Res**, v. 48, n. 20, p. 5818-5824, Oct 15 1988. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

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> >.

WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1138-1146, Nov 22 1991. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659741> >.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D.; HOLLSTEIN, M. J. N. R. C. p53 polymorphisms: cancer implications. v. 9, n. 2, p. 95-107, 2009. ISSN 1474-1768.

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> >.

WU, S. et al. Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3490-3490, 2018. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30154431> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113228/> >.

XUAN, D. et al. APOBEC3 deletion polymorphism is associated with breast cancer

risk among women of European ancestry. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 10, p. 2240-2243, Oct 2013. ISSN 0143-3334 (Print) 0143-3334.

YILDIRIM, N. K. et al. Possible role of stress, coping strategies, and life style in the development of breast cancer. **Int J Psychiatry Med**, v. 53, n. 3, p. 207-220, May 2018. ISSN 1541-3527 (Electronic) 0091-2174 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29292669> >.

YILDIRIM, N. K. et al. Possible role of stress, coping strategies, and life style in the development of breast cancer. **Int J Psychiatry Med**, v. 53, n. 3, p. 207-220, May 2018. ISSN 0091-2174.

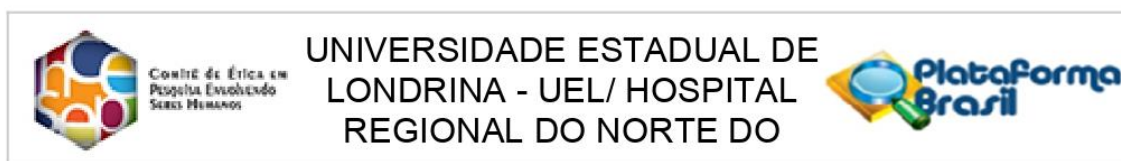
YUE, W. et al. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. **Steroids**, v. 78, n. 2, p. 161-170, Feb 2013. ISSN 0039-128x.

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 -gama 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

**Telefone:** (43)3371-5455

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**E-mail:** cep268@uel.br



Conselho de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL  
REGIONAL DO NORTE DO



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

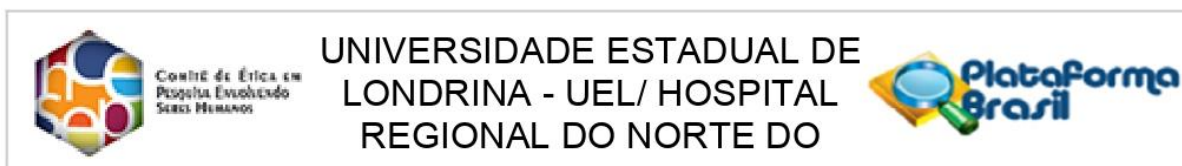
**CEP:** 86.057-970

**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	Editais 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



CONSELHO DE ÉTICA EM  
PESQUISA ENVOLVENDO  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Implicações Prognósticas e Terapêuticas de Marcadores Genéticos e Imunológicos no Câncer

**Pesquisador:** Maria Angelica Ehara Watanabe

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 1

**CAAE:** 73557317.0.0000.5231

**Instituição Proponente:** Programa de PG em Patologia Experimental

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.297.112

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo vinculado ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental/UEL. Segundo a pesquisadora o câncer ocorre decorrente da proliferação descontrolada das células devido a vários fatores, sejam eles ambientais ou genéticos, que podem culminar com invasão tecidual próxima ao tumor primário ou até mesmo o desenvolvimento de metástases. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, e sua evolução é dependente da interação tumor-hospedeiro. O conhecimento sobre os diferentes tipos de tumores tem sido muito explorado mas o grande desafio da oncologia tem sido o entendimento dos mecanismos moleculares que envolvem estes tumores malignos. Dentro deste contexto, os aspectos imunológicos, moleculares e epigenéticos, das citocinas e dos receptores de quimiocinas e receptores de citocinas, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização foram os temas escolhidos para serem abordados neste projeto, uma vez que todos estes parâmetros podem ter relevância clínica e também constituírem alvos promissores que no futuro podem ser valiosos na avaliação do prognóstico e no delineamento terapêutico. A pesquisa será realizada no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas da UEL. Serão selecionadas um total de 1150 amostras provenientes do Hospital de Câncer de Londrina:

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Conselho de Ética em  
Pesquisa Envolvendo  
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.297.112

- 300 Amostras de tecido normal e tumoral de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe, câncer colorretal, meduloblastoma, neuroblastoma e tumor adrenocortical. a realização do ensaio de imuno-histoquímica. Essas análises serão realizadas no Laboratório de Polimorfismos DNA e Imunologia da UEL.
- 200 Amostras de tecido tumoral e saudável a fresco, de pacientes diagnosticados com cancer de mama, laringe e colorretal, provenientes de cirurgia para excisão do tumor do mesmo hospital para extração de DNA, RNA e sobrenadante.
- 300 Amostras de sangue de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, câncer de laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos, que serão coletadas para obtenção de DNA, RNA e plasma para estudos de polimorfismos genéticos, expressão gênica e proteica.
- 50 Amostras de medula de pacientes pediátricos diagnosticados com leucemias agudas (linfóide e mielóide) para extração de RNA e plasma.
- 300 Amostras de sangue periférico e/ou saliva de controles saudáveis, sem histórico de neoplasia, para extração de DNA, RNA e plasma.

Serão realizados análise de PCR-RFLP para estudo das variantes alélicas polimórficas, análise de imunohistoquímica, análise da expressão gênica por PCR quantitativo, análise da Expressão Proteica por ELISA. Os participantes da pesquisa serão convidados a participar do estudo durante o atendimento clínico no Serviço de Oncologia do Hospital do Câncer de Londrina. No grupo caso serão incluídas todos os pacientes que tiverem diagnóstico para câncer de mama, câncer laringe e câncer colorretal e tumores pediátricos. E no grupo controle serão incluídos indivíduos saudáveis sem histórico de neoplasias, doenças autoimunes e infecções. Serão excluídos pacientes com doenças infecciosas ou autoimunes.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar a presença dos polimorfismos genéticos, expressão gênica e expressão proteica do fator de transcrição FOXP3, das citocinas TGFB1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INFg, das quimiocinas CXCL12 e CCL5, das proteínas SMAD, IGF1, CTLA4, dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRII, TRIII, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQOI, GSTT1 e GSTM1, no tecido tumoral e normal, e no sangue periférico dos pacientes com câncer de mama, laringe e colorretal e nos tumores pediátricos.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA ENVOLVENDO  
SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.297.112

#### Objetivos Secundários:

- Detectar a presença dos polimorfismos genéticos do FOXP3, TGF, IL10, IL12A, IL35 IL1B, TNFa e INF gama, das quimiocinas CXCL12 e CCL5 dos receptores de quimiocinas CXCR4, CXCR7 e CCR5 e receptores de citocinas TRIL, TRIL, GIPR, IL1RN e IL7R, dos genes JAK2, ROR e p53, e também das enzimas de metabolização NQO1, GSTT1 e GSTM1 nos DNAs extraídos do câncer de mama, câncer de cólon, tumores de laringe e câncer colorretal e para os tumores pediátricos (tumor de Wilms, meduloblastoma, neuroblastoma, leucemias agudas, linfomas e tumor adrenocortical).
- Avaliar a expressão gênica dos genes acima citados por PCR quantitativo.
- Realizar imunohistoquímica para FOXP3, TGFb1, IL10, IL12A, IL35 IL1B, CXCL12 CCL5, SMAD, CXCR4, CCR5, p53 nos tecidos tumoral e saudável fixados em formalina tamponada e embebido em parafina, para avaliar a expressão proteica.
- Avaliar a expressão proteica por ELISA dos genes CXCL12, TGF-, FOXP3, CCL5 e INF gama.
- Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos na expressão gênica e proteica desses genes.
- Comparar a frequência alélica dos polimorfismos dos genes supracitados e compará-los com os dados clinicopatológicos dos pacientes com os diferentes tipos de câncer.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora o risco que os participantes da pesquisa podem ter neste projeto é quanto ao desconforto na hora da coleta de sangue periférico, porém a coleta será efetuada por profissional habilitado seguindo-se todas as normas de biossegurança, e caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pelos coletores responsáveis. O estudo não trará benefícios diretos aos participantes, mas pretende-se obter marcadores que possam fornecer subsídios adicionais de auxílio prognóstico e delineamento terapêutico de pacientes com câncer de mama, cancer laringe e cancer colorretal e tumores pediátricos. Espera-se também obter uma integração maior entre as instituições colaboradoras, Universidade Estadual de Londrina e Hospital do Câncer de Londrina. O envolvimento de pesquisadores colaboradores permitirá a formação de profissionais qualificados para atuarem nas áreas de Imunologia e Genética do câncer, disseminando o conhecimento. Pretende-se contribuir com um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos com a patogênese das doenças acima referidas e futuramente com a melhoria na qualidade de vida dos pacientes, através da inclusão de marcadores que, de alguma forma, possam ser aplicados futuramente na prática clínica.

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

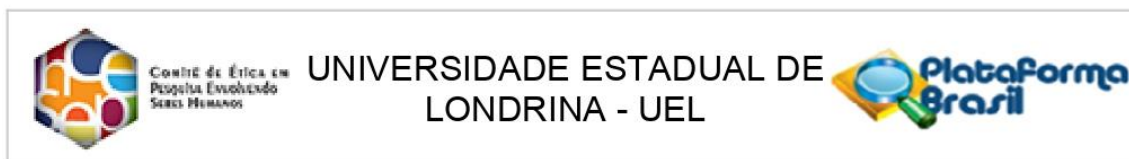
**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.297.112

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosto devidamente assinada pelo Coordenador do Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental, cronograma adequado e orçamento detalhado. Apresentou 04 modelos de TCLE adequados em forma de convite (adultos e crianças caso e adulto e crianças controle saudáveis). Apresentou ainda termo de autorização do hospital e declaração de 02 bioquímicas responsáveis pelas coletas das amostras.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Relatoria realizada em reunião ordinária em 25/09/2017

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_963665.pdf	11/08/2017 16:08:50		Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	24/07/2017 16:01:36	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Cronograma	9_cronograma.pdf	18/07/2017 15:57:53	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	8_Projeto_Cancer_2017.pdf	18/07/2017 15:30:16	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Outros	6_Declaracao_HCL.pdf	18/07/2017 15:29:55	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4_TCLE_pacientes_adultos.pdf	18/07/2017 15:28:43	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	3_TCLE_crianças.pdf	18/07/2017 15:28:12	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	2_TCLE_controles_saudaveis_crianca.pdf	18/07/2017 15:27:11	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

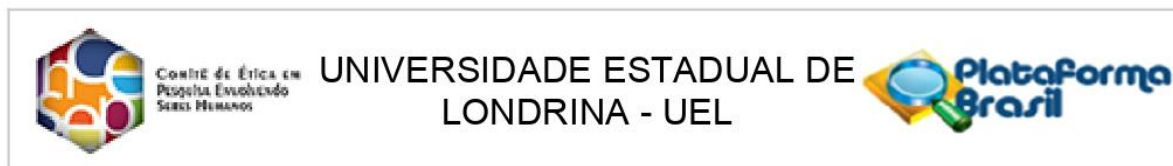
**UF:** PR

**Telefone:** (43)3371-5455

**CEP:** 86.057-970

**Município:** LONDRINA

**E-mail:** cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.297.112

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	1_TCLE_controles_saudaveis_adultos.pdf	18/07/2017 15:25:12	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	7_Termo_responsabilidade_coleta.pdf	18/07/2017 15:24:58	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito
Declaração de Pesquisadores	5_Termo_de_Confidencialidade_e_Sigilo.pdf	18/07/2017 15:22:23	Maria Angelica Ehara Watanabe	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

LONDRINA, 26 de Setembro de 2017

---

**Assinado por:  
Rosana Lopes  
(Coordenador)**

**Endereço:** LABESC - Sala 14

**Bairro:** Campus Universitário

**UF:** PR

**Município:** LONDRINA

**CEP:** 86.057-970

**Telefone:** (43)3371-5455

**E-mail:** cep268@uel.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA AS PACIENTES COM  
CÂNCER DE MAMA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada **“Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer”**, que tem por objetivo analisar determinados tipo de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

**Procedimentos do Estudo:**

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico. Em caso de tecido mamário tumoral, o tecido retirado durante a cirurgia será encaminhado para análise e o restante será utilizado para a realização deste projeto.

**Confidencialidade da Pesquisa**

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue e tecido obtidos, serão utilizados para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

**Consentimento livre esclarecido e informado:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecida pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente desse estudo sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos no meu atendimento neste projeto.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, 20 \_\_\_\_.

Assinatura do doador (ou responsável):

\_\_\_\_\_

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA AS MULHERES SAUDÁVEIS



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Informações sobre a pesquisa:**

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “**Estudo de marcadores genéticos, epigenéticos, moleculares e imunológicos em câncer**”, que tem por objetivo analisar determinados tipo de moléculas que podem influenciar na imunidade da paciente. Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Sua participação não é obrigatória e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso acarrete qualquer penalidade.

**Procedimentos do Estudo:**

Os procedimentos da pesquisa envolvem a obtenção de 5mL de sangue periférico para análise das células e moléculas do sistema imunológico.

**Confidencialidade da Pesquisa**

As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

A amostra de sangue e tecido obtidos, serão utilizados para obtenção de DNA e RNA para a realização deste projeto. A participação no estudo não acarretará custos para você e não haverá nenhuma compensação financeira adicional. A coordenadora do projeto é a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Angelica Ehara Watanabe, que pode ser encontrada no endereço: Rod. Celso Garcia cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Tel / Fax: (43) 3371-5629, como também procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490.

Pesquisador Responsável \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

**Consentimento livre esclarecido e informado:**

Eu, \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, declaro que estou de acordo com as informações contidas neste documento, fui devidamente esclarecida pelo(s) pesquisador(es) dos objetivos e procedimentos da pesquisa de maneira clara e detalhada, e esclareci minhas dúvidas. Concordo em participar voluntariamente como doadora saudável desse estudo sendo que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante a execução deste projeto.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_, 20 \_\_\_\_.

Assinatura do doador (ou responsável): \_\_\_\_\_