



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MORFOTECNOLOGIA

EMMANUEL NÓBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE-14 E p16^{INK4a} EM LESÕES
PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL: UMA ABORDAGEM
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Recife
2025

EMMANUEL NÓBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE-14 E p16^{INK4a} EM LESÕES
PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL: UMA ABORDAGEM
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfologia, métodos clássicos e avançados.

Orientador: Dr. Jacinto da Costa S. Neto

Recife
2025

Arruda, Emmanuel Nobrega Travassos de.

Análise da expressão da metaloproteinase-14 e p16INK4a em lesões precursoras e câncer cervical: uma abordagem imuno-histoquímica / Emmanuel Nobrega Travassos de Arruda. - Recife, 2025.

86f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro De Biociências, Programa De Pós-Graduação Em Morfotecnologia, 2025.

Orientação: Jacinto da Costa Silva Neto.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Imuno-histoquímica; 2. Papillomavirus humano; 3. Neoplasia do colo do útero; 4. Metaloproteinase-14; 5. P16INK4a. I. Neto, Jacinto da Costa Silva. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

EMMANUEL NÓBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE-14 E p16^{INK4a} EM LESÕES
PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL: UMA ABORDAGEM
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Morfotecnologia. Área de concentração: Morfologia, métodos clássicos e avançados.

Orientador: Dr. Jacinto da Costa S. Neto

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (orientador)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dra. Juliana Pinto de Medeiros (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dra. Vanessa Emanuelle Pereira Santos (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dra. Anna Jéssica Duarte Silva (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico este trabalho a todas as pessoas que resistiram, resistem e resistirão ao câncer, a luta é diária!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jacinto Costa, por ter me apresentado o universo da citopatologia, pela oportunidade como monitor na graduação e pela orientação nos caminhos do mestrado e futuro doutorado.

A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo substancial apoio financeiro, contribuindo para o desenvolvimento da pesquisa no Brasil.

Ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco - HC-UFPE/EBSERH, na pessoa da Dra. Arione Vieira, biomédica responsável pelo serviço de Anatomia Patológica desta instituição, por permitir o desenvolvimento do presente trabalho, não medindo esforços para a sua realização.

A Anderson, por todo o apoio incondicional.

A Romildo Luciano da Silva, pelo apoio e orientação na obtenção das amostras.

Aos amigos Lidiane, Helbert, Gabriel, Isa e Julliano, pela companhia, paciência e dedicação, além de tornarem meus dias de mestrado mais alegres e prazerosos.

Aos professores integrantes do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco.

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo, retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”

~ Paulo Freire

RESUMO

Mundialmente, o câncer cervical ainda é um grande desafio para a saúde pública, em 2022 foram notificados 661.021 novos casos, resultando em 348.189 mortes. Existem dois tipos principais de câncer de colo do útero, sendo o mais comum o carcinoma de células escamosas (CCE), seguido pelo adenocarcinoma endocervical (ADC). O desenvolvimento dessas neoplasias está estreitamente relacionado ao papilomavírus humano (HPV), exigindo uma infecção persistente e prolongada por subtipos de alto risco, como HPV16 e HPV18. Atualmente, o rastreio é realizado por meio da citologia oncológica e encaminhado, caso necessário, para colposcopia e biópsia. Contudo, ainda ocorre um número elevado de resultados falso-positivos e falso-negativos, necessitando o estabelecimento de biomarcadores capazes de aumentar a precisão do diagnóstico. Entre as moléculas com potencial para se tornar um biomarcador, tem-se a metaloproteinase-14 (MMP-14) da família das metaloproteinases de matriz, bem como p16^{INK4a}, proteína supressora tumoral que desempenha um importante papel no ciclo celular. Foram utilizadas amostras de biópsia cervical arquivadas no serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Por meio da imuno-histoquímica avaliou-se a expressão da MMP-14 e p16^{INK4a} em lesões precursoras e CCE. Os resultados demonstraram que o perfil das pacientes é constituído, na sua maioria, de mulheres pardas, com média de 39 anos à época do diagnóstico e início da atividade sexual aos 17 em média. Houve variação na intensidade de expressão entre os biomarcadores, a p16^{INK4a} apresentou intensidade imunorreativa gradualmente crescente e a MMP-14, variável e decrescente. Com base nos testes estatísticos realizados, observou-se que tanto a p16^{INK4a} quanto a MMP-14 apresentaram boa sensibilidade, sugerindo seu uso na triagem primária, visto que são capazes de identificar casos positivos com maior segurança. Vale ressaltar que o uso individualizado tanto da p16^{INK4a} como da MMP-14 não é recomendado, já que seus níveis de expressão são influenciados por processos inflamatórios agudos ou crônicos. Portanto, a aplicação desses biomarcadores no contexto das lesões cervicais é promissora, porém são necessários estudos que possam diferenciar expressões fisiológicas daquelas encontradas em processos neoplásicos, provocados ou não pelo HPV.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica; Papillomavirus humano; Neoplasia do colo do útero; Metaloproteinase-14; p16INK4a.

ABSTRACT

Globally, cervical cancer remains a significant public health challenge. In 2022, there were 661,021 new cases reported, resulting in 348,189 deaths. There are two main types of cervical cancer, with the most common being squamous cell carcinoma (SCC), followed by endocervical adenocarcinoma (ADC). The development of these neoplasms is closely linked to human papillomavirus (HPV), requiring persistent and prolonged infection by high-risk subtypes such as HPV16 and HPV18. Currently, screening is conducted through oncotic cytology and, if necessary, referred for colposcopy and biopsy. However, there is still a high number of false-positive and false-negative results, necessitating the establishment of biomarkers capable of increasing diagnostic accuracy. Among the molecules with potential to become biomarkers are matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) from the matrix metalloproteinase family, as well as p16INK4a, a tumor suppressor protein that plays an important role in the cell cycle. Archived cervical biopsy samples from the Pathological Anatomy Service of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco were used. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of MMP-14 and p16INK4a in precursor lesions and SCC. The results showed that the patient profile predominantly consisted of mixed-race women, with an average age of 39 at the time of diagnosis and an average age of 17 at the onset of sexual activity. There was variation in the intensity of expression between the biomarkers, with p16INK4a showing a gradually increasing immunoreactive intensity and MMP-14 showing a variable and decreasing intensity. Based on the statistical tests conducted, it was observed that both p16INK4a and MMP-14 exhibited good sensitivity, suggesting their use in primary screening, as they are capable of identifying positive cases more reliably. It is important to note that the individualized use of either p16INK4a or MMP-14 is not recommended, as their expression levels are influenced by acute or chronic inflammatory processes. Therefore, the application of these biomarkers in the context of cervical lesions is promising, but further studies are needed to differentiate physiological expressions from those found in neoplastic processes, whether or not caused by HPV.

Keywords: Immunohistochemistry; Human Papillomavirus; Cervical Neoplasm; Metalloproteinase-14; p16INK4a

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Genoma do HPV	16
Figura 2	Ciclo de infecção do HPV	17
Figura 3	DNA episomal e integração ao genoma da célula hospedeira	18
Figura 4	Coilócitos em células escamosas	22
Figura 5	Células do tipo HSIL	23
Figura 6	Carcinoma de células escamosas (CCE)	24
Figura 7	Atipia de células glandulares (endocervicais)	24
Figura 8	Atipia de células glandulares (endometriais)	25
Figura 9	Células endocervicais em formação de plumagem	26
Figura 10	Células endocervicais em formação de roseta	26
Figura 11	Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i>	27
Figura 12	Adenocarcinoma endocervical	27
Figura 13	Adenocarcinoma endometrial	28
Figura 14	Fotomicrografia de cortes histológicos do colo do útero	30
Figura 15	Estrutura das diferentes metaloproteinases	31
Figura 16	Ativação das MMPs expressas em humanos	33
Figura 17	Mecanismo de ação da p16 ^{INK4a}	35
Figura 18	Imagem gerada em 8 bits pelo <i>ImageJ</i>	40
Figura 19	Histograma gerado pelo <i>ImageJ</i>	41
Figura 20	Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16 ^{INK4a} em NIC-1	50
Figura 21	Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16 ^{INK4a} em NIC-2	51
Figura 22	Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16 ^{INK4a} em NIC-3	51
Figura 23	Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16 ^{INK4a} em CCE	52

LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS E TABELAS

Quadro 1	Genes do HPV e suas funções	18
Quadro 2	Classificação dos subtipos do HPV	19
Quadro 3	Classificação Bethesda para relato de citologia cervical	20
Quadro 4	Terminologia NIC	29
Quadro 5	Terminologia atual NIC	29
Quadro 6	Tipos de metaloproteinasas e seus respectivos substratos	32
Quadro 7	Distribuição das lâminas confeccionadas	39
Gráfico 1	Frequência relativa à Etnia separadas por grau da lesão	48
Gráfico 2	Frequências absolutas da idade da 1ª relação sexual separadas por grau da lesão	48
Gráfico 3	Frequências absolutas da idade ao diagnóstico separadas por grau da lesão	49
Gráfico 4	Intensidade da imunorreação da MMP-14	52
Gráfico 5	Intensidade da imunorreação da p16 ^{INK4a}	53
Gráfico 6	Curvas das médias marginais estimadas para MMP-14	56
Gráfico 7	Curvas das médias marginais estimadas para p16 ^{INK4a}	56
Gráfico 8	Curvas ROC para NIC-1	57
Gráfico 9	Curvas ROC para NIC-2	58
Gráfico 10	Curvas ROC para NIC-3	58
Gráfico 11	Curvas ROC para CCE	58
Tabela 1	Estatística descritiva referente as informações extraídas dos prontuários	47
Tabela 2	Distribuição relativa às intensidades de imunorreação	49
Tabela 3	Teste de Kruskal-Wallis para intensidades de MMP-14 e p16 ^{INK4a}	53
Tabela 4	Comparação das intensidades de imunorreação da MMP-14 entre os graus de lesão	54
Tabela 5	Comparação das intensidades de imunorreação da p16 ^{INK4a} entre os graus de lesão	54
Tabela 6	Matriz de correlação de Spearman e Pearson entre as intensidades e grau da lesão	55
Tabela 7	Regressão logística para as intensidades de imunorreação da MMP-14 e p16 ^{INK4a}	55
Tabela 8	Dados obtidos para cálculo das curvas ROC	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ADC	Adenocarcinoma endocervical
ACG	Atipia de células glandulares
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ASC-US/ ASC-H	<i>Atypical squamous cells</i>
AUC	Área sobre a curva
CCE	Carcinoma de células escamosas
CB	Centro de biociências
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
IHC	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do câncer
ISTs	Infecções sexualmente transmissíveis
JEC	Junção escamocolunar
LPCM	Laboratório de pesquisas citológicas e moleculares
HSIL	Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau
LCR	<i>Long control region</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
MMP-14	Metaloproteinase-14
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
ORF	<i>Open reading frames</i>
HPV	Papilomavírus humano
pRb	Proteína do retinoblastoma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RECK	<i>Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs</i>
SOE	Sem outras especificações
PBS	Tampão fosfato
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteases</i>
URR	Região regulatória da transcrição e replicação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 A ONCOGÊNESE E O HPV	16
2.2 A PROGRESSÃO DA LESÃO CERVICAL	20
2.2.1 Critérios citopatológicos	20
2.2.2 Critérios histopatológicos	28
2.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ	30
2.4 PROTEÍNA p16 ^{INK4a}	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA	37
4.2 LOCAL DO ESTUDO	37
4.3 ASPECTOS ÉTICOS	37
4.4 AMOSTRAS	38
4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	39
4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	39
4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
4.8 ANÁLISE DAS LÂMINAS	40
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 ARTIGO ORIGINAL	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODO	45

Imuno-Histoquímica	46
RESULTADOS	47
DISCUSSÃO	59
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64
APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O MESTRADO	68
APÊNDICE B - PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	80
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP N.º 6588679	81

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer cervical ainda é um grande desafio para a saúde pública, em 2022 foram notificados 661.021 novos casos, resultando em 348.189 mortes, sendo o 8º mais incidente e o 9º em número de óbitos (Bray *et al.*, 2024). Nos países em desenvolvimento, alguns aspectos contribuem para uma taxa de mortalidade ascendente, 19,3 por 100.000 habitantes, entre elas destacam-se as condições socioeconômicas desfavoráveis e dificuldades no acesso aos serviços de saúde (Mekonnen; Mittiku, 2023; Ntanasis-Stathopoulos *et al.*, 2020).

Uma vez estabelecida a infecção pelo HPV, bem como a sua persistência, dois tipos principais de câncer de colo do útero podem ter início, o mais comum, o carcinoma de células escamosas (CCE), seguido pelo adenocarcinoma endocervical (ADC) (Bray *et al.*, 2024). O desenvolvimento dessas neoplasias está estreitamente relacionado ao HPV, tendo como subtipos mais prevalentes o HPV16 e HPV18, responsáveis por mais de 80% dos casos de câncer cervical (Ma; Yang, 2021). O processo de infecção pelo HPV envolve, principalmente, duas proteínas oncogênicas, E6 e E7, que, de forma sinérgica, podem "imortalizar" a célula hospedeira, permitindo que a divisão celular ocorra continuamente (Zur Hausen, 2002).

Entretanto, não são todas as infecções pelo HPV que culminam em câncer. Geralmente, o sistema imunológico consegue debelar a infecção e, quando associado a um rastreamento eficaz, as taxas de cura são significativamente altas (Oliveira *et al.*, 2022). No Brasil, recomenda-se que o início do rastreamento seja a partir dos 25 anos, com repetições anuais ou a cada três anos, dependendo do resultado do exame citológico (Silva, 2016). Porém, apesar da importância do rastreamento, ainda é possível observar um número elevado de resultados falso-positivos e falso-negativos, necessitando o estabelecimento de biomarcadores capazes de aumentar a precisão do diagnóstico, além de fornecer informações a respeito da progressão da lesão (Albuquerque, 2016).

Entre as moléculas com potencial para se tornar um biomarcador, tem-se a família das metaloproteinases de matriz, em especial, a metaloproteinase-14 (MT1-MMP ou MMP-14). No geral, as metaloproteinases possuem como principal função a degradação da matriz extracelular (MEC), remodelando o tecido conjuntivo e, ainda, atuando em processos inflamatórios, sendo divididas em subfamílias, entre elas as colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinases, além das de membrana ou transmembrana celular (Chen *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2022). Estudos envolvendo tecido cervical sugerem que a

expressão acentuada das metaloproteinases pode indicar a progressão precoce do tumor, devido ao seu aumento gradual em lesões pré-invasivas ou precursoras. (Vieira *et al.*, 2022).

Particularmente, a MMP-14 atua degradando a matriz extracelular e remodelando o tecido conjuntivo, além de contribuir para a perda de adesão celular, angiogênese tumoral e transição epitelial-mesenquimal, influenciando significativamente o microambiente onde a célula tumoral está presente (Chen *et al.*, 2021). Porém, sua expressão e de outras metaloproteinases é dependente de regulação, sendo esta realizada pela expressão de inibidores do tipo TIMPs¹ (do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteases*), sendo de quatro tipos (TIMP-1, 2, 3 e 4) e a RECK² (*Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*), que participa de diversos processos fisiológicos, incluindo angiogênese, embriogênese e manutenção da MEC (Herbster *et al.*, 2021).

Somada à expressão das metaloproteinases de matriz, tem-se a p16^{INK4a}, proteína supressora tumoral que desempenha um importante papel no ciclo celular. A partir da sua superexpressão é possível estabelecer uma relação entre a intensidade da imunorreação e o grau de disfunção do ciclo celular em diversas neoplasias, em particular nas lesões associadas ao HPV, pois a sua presença indica o comprometimento funcional da via da proteína do retinoblastoma (pRb) promovida pela expressão da oncoproteína E7 (Mandal *et al.*, 2020).

Dessa forma, avaliar a expressão tecidual da MMP-14, bem como da p16^{INK4a}, por meio da imuno-histoquímica e, ainda, correlacioná-las com os diferentes graus de lesão cervical, torna-se essencial para o entendimento da progressão e do microambiente tumoral, além de contribuir para a conclusão diagnóstica, avaliação prognóstica e tomada de decisão terapêutica.

¹ Inibidor tecidual de metaloproteinase;

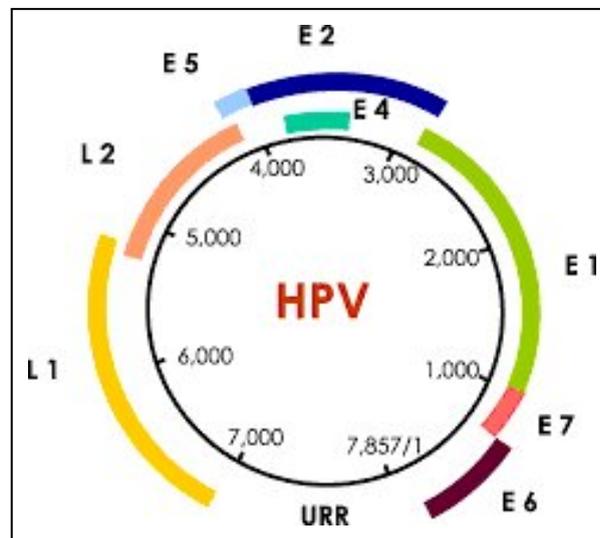
² Proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A ONCOGÊNESE E O HPV

A oncogênese do câncer cervical necessita da infecção prévia e persistente pelo HPV e, além disso, que o DNA do vírus esteja integrado ao genoma da célula hospedeira (Zur Hausen, 2002). Estruturalmente, o HPV possui diâmetro variando entre 44 e 55 nm, formato icosaédrico, não envelopado, composto por um capsídeo constituído por 72 capsômeros, o qual abarca seu material genético formado por uma fita dupla de DNA possuindo, aproximadamente, 8000 pares de bases divididos em duas regiões, uma codificante e outra não codificante. Na primeira, têm-se as chamadas fases de leitura aberta (ORF, do inglês, *Open Reading Frames*), responsáveis pela codificação das proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), bem como, daquelas consideradas tardias (L1 e L2), enquanto, na segunda região, denominada de LCR³ (do inglês, *Long Control Region*) têm-se, o controle da replicação viral, além da transcrição dos seus genes (figura 1) (Woodman; Collins; Young, 2007; Zur Hausen, 2002).

Figura 1 - Genoma do HPV



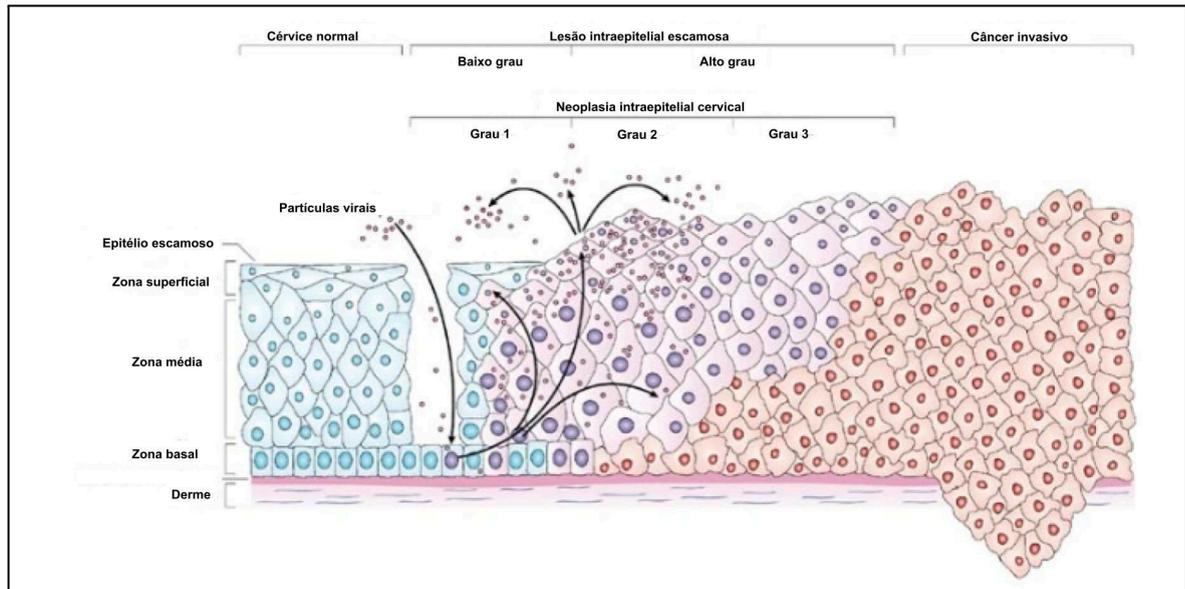
Fonte: Adaptado de Silva Filho *et al.* (2020).

Legenda: A figura representa, esquematicamente, o genoma do HPV, com os genes precoces E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e os genes tardios L1 e L2, além da região regulatória da transcrição e replicação (URR).

³ Região de controle longo.

Diferentemente de outras famílias de vírus, o papilomavírus possui tropismo por células mais jovens, com capacidade proliferativa preservada, acessando o estrato mais profundo do epitélio, por meio de fissuras que facilitam sua entrada e, conseqüentemente, atingindo a camada basal, onde as células, mais imaturas, preservam sua capacidade mitótica, condição necessária para a replicação viral (Zur Hausen, 2002).

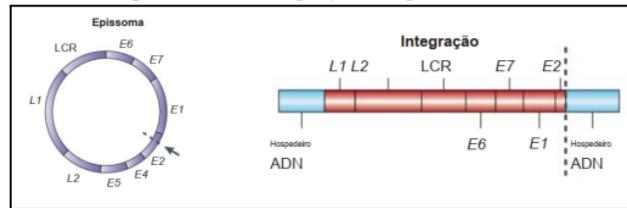
Figura 2 - Ciclo de infecção do HPV



Fonte: Adaptado de Woodman, Collins e Young (2007)

Legenda: A figura representa, esquematicamente, o ciclo de infecção pelo HPV e o processo de transformação do epitélio até a invasão. Note que o vírus atinge a camada basal, inicia o processo de replicação e após sua integração, compromete toda a extensão epitélio.

Uma vez estabelecido na camada basal, tem início o que Zur Hausen (2002) denominou de expansão lateral, onde o DNA do HPV, ainda episossomal, permanece no núcleo da célula hospedeira com o intuito de replicação do seu material genético e construção de cópias do capsídeo. Câmara *et al.* (2008), em estudo relativo à carcinogênese e imunogênese do HPV, discorrem que, inicialmente, o material genético do HPV permanece na forma episossomal até o momento da sua integração ao genoma da célula hospedeira, fato este, marcado pelo rompimento da região de E2 do seu genoma (Figura 3).

Figura 3 - DNA episossoma e integração ao genoma da célula hospedeira

Fonte: Adaptado de Woodman, Collins e Young (2007)

Legenda: Na esquerda, DNA episossoma do HPV, mantido durante a fase replicativa do vírus e, a direita, quebra do DNA na região de E2 para integração.

Desde a fase de expansão lateral, passando pela integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, o HPV provoca algumas modificações no maquinário celular, com o intuito de viabilizar a produção de partículas virais. Essas modificações são regidas pelos genes precoces e tardios, culminando com a liberação de *virions* para o meio extracelular. Cada gene é responsável pela síntese de uma determinada proteína (quadro 1), com funções específicas voltadas, principalmente, para a desregulação do sistema imune e perpetuação do ciclo celular (Câmara *et al.*, 2008; Ibeanu, 2011; Zur Hausen, 2002).

Quadro 1 - Genes do HPV e suas funções

Gene do HPV	Função
E1 e E2	Replicação viral
	Autorregulação por E2
	Repressão da expressão de E6 e E7 por E2
E4	Desregulação imune
	Facilita a liberação de partículas virais
E5	Desregulação imune
	Inibição da apoptose
E6	Degradação da p53 e progressão do ciclo celular
	Inibição da apoptose e transformação celular
E7	Inibição da pRb e progressão do ciclo celular
L1 e L2	Síntese do capsídeo viral
	Antigenicidade

Fonte: Adaptado de Ibeanu (2011)

Contudo, não todas as infecções pelo HPV que evoluem para câncer. Para aquelas que têm esse desfecho, são necessários dois fatores: o primeiro é o subtipo viral (quadro 2), classificado como de alto risco, e o segundo é o tempo de infecção, persistente e duradouro, podendo, em determinadas situações, estender-se por vários anos (Ibeanu, 2011; Woodman; Collins; Young, 2007). As lesões cervicais geralmente, desenvolvem-se no decorrer de vários anos, estima-se que o nexo temporal entre uma situação de ausência de lesão e o estabelecimento do câncer de colo uterino seja de aproximadamente 15 anos (Jamal *et al.*, 2020; Silva Neto, 2019).

Uma vez estabelecida a infecção, a manutenção do ciclo viral pede a expressão das proteínas virais E6 e E7, mantidas em níveis baixos pela expressão de E2. Todavia, em determinado momento, esse equilíbrio é perturbado, ocorrendo a quebra do genoma viral na região codificante de E2 e consequente superexpressão de E6 e E7 (Zur Hausen, 2002).

Quadro 2 - Classificação dos subtipos do HPV.

Subtipos de alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82
Subtipos de baixo risco	6, 11, 40, 42 - 44, 54, 61, 72, 81

Fonte: Adaptado de Ibeanu (2011)

A partir deste ponto, quebra do genoma viral, com consequente integração ao genoma da célula hospedeira e superexpressão de E6 e E7, ocorre a desregulação dos mecanismos de controle do ciclo celular, com inibição da apoptose e dos genes supressores tumorais. Dessa forma, a célula recebe estímulos excessivos para proliferação, resultando em instabilidade cromossômica e modificações no DNA da célula hospedeira, tendo-se início a transformação neoplásica (Zur Hausen, 2002).

Com a transformação neoplásica, o genoma viral é rompido na região de E2, integrando-se ao DNA da célula hospedeira, que até este momento permanecia na forma episomal, comprometido com a replicação de partículas virais, bem como, a formação do capsídeo e consequente liberação para o meio extracelular (Câmara *et al.*, 2008; Woodman; Collins; Young, 2007; Zur Hausen, 2002).

Contudo, apesar da integração do genoma viral e a progressão do câncer cervical ocorrerem separadamente, a superexpressão de E6 e E7 é o evento mais importante na oncogênese promovida pelo HPV, pois estimula o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS) da célula, causando a destruição da proteína do retinoblastoma (pRb) e, com isso, forçando o

ciclo celular para a fase S, além disso, a p53 é inativada, desregulando a sinalização para apoptose (Volkova; Pashov; Omelchuk, 2021).

2.2 A PROGRESSÃO DA LESÃO CERVICAL

2.2.1 Critérios citopatológicos

O colo do útero, também conhecido como cérvix, pode ser descrito como uma pequena passagem localizada entre o útero e a vagina. Apresenta dois tipos de tecidos epiteliais distintos: o escamoso estratificado não queratinizado na parte externa (ectocérvice) e o colunar simples na parte interna (endocérvice), unidos pela junção escamocolunar (JEC) (Silva Neto, 2019). A coleta das amostras cervicovaginais é realizada tanto na ecto, como na endocérvice, utilizando-se escova cervicovaginal e espátula de Ayre, o material coletado é então depositado sobre a lâmina e fixado com álcool absoluto ou spray fixador, em seguida, inicia-se a análise das lâminas, visando observar as características dos tipos celulares presentes, bem como a magnitude da resposta inflamatória, a resposta do epitélio aos estímulos hormonais e, prioritariamente, a presença de quaisquer alterações celulares que possam indicar processos neoplásicos (Lima *et al.*, 2012).

As características das amostras coletadas foram agrupadas em um sistema de classificação denominado de Sistema Bethesda (quadro 3), sendo este utilizado para uniformizar os resultados da citologia cervicovaginal, fornecendo diretrizes específicas para a descrição dos achados, facilitando a comunicação entre profissionais de saúde, além de auxiliar na definição da conduta terapêutica mais adequada para os pacientes (Wilbur, 2018).

Quadro 3 - Classificação Bethesda para relato de citologia cervical

Tipo de espécime	Adequação
<ul style="list-style-type: none"> - Citologia convencional; - Citologia em base líquida. 	<ul style="list-style-type: none"> - Satisfatório para análise; - Insatisfatório: motivo.
Microbiota	
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Trichomonas vaginalis</i>; - Organismos consistentes com <i>Candida spp.</i>; - Desvio de flora sugestivo de vaginose bacteriana; - Alterações consistentes com herpes simples; - Alterações consistentes com citomegalovírus. 	

Categorização (epitélio escamoso)
<ul style="list-style-type: none"> - NILM - negativo para lesão intraepitelial e malignidade; - ASC-US - atipia de células escamosas de significado indeterminado; - LSIL - lesão de baixo grau; - ASC-H - atipia de células escamosas de significado indeterminado, não sendo possível excluir lesões de alto grau; - HSIL - lesão de alto grau; - Carcinoma de células escamosas (CCE).
Categorização (epitélio glandular)
<ul style="list-style-type: none"> - Atipia de células glandulares, sem outras especificações (SOE); - Atipia de células endocervicais, favorecendo neoplasia; - Adenocarcinoma endocervical <i>in situ</i>; - Adenocarcinoma endocervical e endometrial.

Fonte: Adaptado de Wilbur (2018)

No geral, as lesões escamosas podem ser classificadas em três grupos, aquelas que ocorrem antes da integração do genoma viral, denominadas de lesões intraepiteliais de baixo grau - LSIL⁴ (do inglês, *low-grade squamous intraepithelial lesion*), aquelas que se desenvolvem a partir da integração do DNA viral, denominadas de lesões intraepiteliais de alto grau - HSIL⁵ (do inglês, *high-grade squamous intraepithelial lesion*) e, aquelas consideradas invasivas, classificadas como carcinoma ou adenocarcinoma, a depender do tipo celular envolvido, célula escamosa ou glandular, respectivamente (Perkins *et al.*, 2023).

Contudo, em determinadas situações, as características presentes em lâmina, não são suficientes para estabelecer um padrão condizente com um ou outro tipo de lesão, nesse caso, as lesões serão consideradas como indeterminadas e classificadas em atipia de células escamosas de significado indeterminado - ASC-US⁶ (do inglês, *atypical squamous cells of undetermined significance*) ou ASC-H (do inglês, *atypical squamous cells of undetermined significance*, não sendo possível a exclusão de lesões de alto grau) (Perkins *et al.*, 2023; Wilbur, 2018).

Nas lesões de baixo grau (LSIL), como dito anteriormente, ocorrem antes da integração do DNA viral, na fase denominada de produtiva, onde a replicação viral é intensa, essa multiplicação leva ao aparecimento de um sinal celular, considerado patognomônico da infecção pelo HPV, denominado de coilócito (figura 4), geralmente, ocorre em células intermediárias e, é caracterizado por uma zona perinuclear clara, com bordas irregulares e

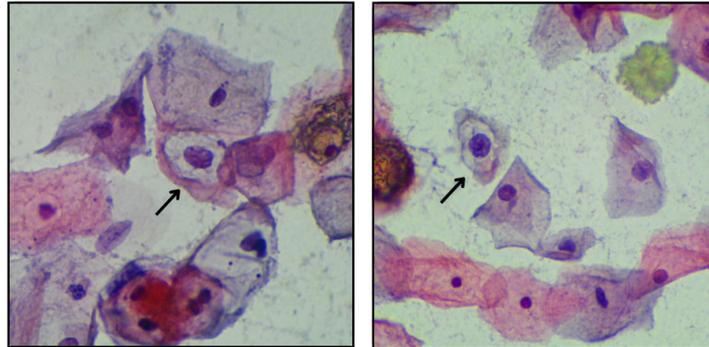
⁴ Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau;

⁵ Lesão escamosa intraepitelial de alto grau;

⁶ Atipia de células escamosas de significado indeterminado;

rodeada de denso citoplasma, além de apresentar atipia nuclear, como irregularidade da borda nuclear. Contudo, nem todas as amostras apresentam tal sinal, nesses casos, considera-se como LSIL, mas sem a confirmação da infecção pelo HPV, sendo a confirmação realizada em momento oportuno, por exemplo, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Silva Neto, 2019; Wilbur, 2018).

Figura 4 - Coilocitos em células escamosas

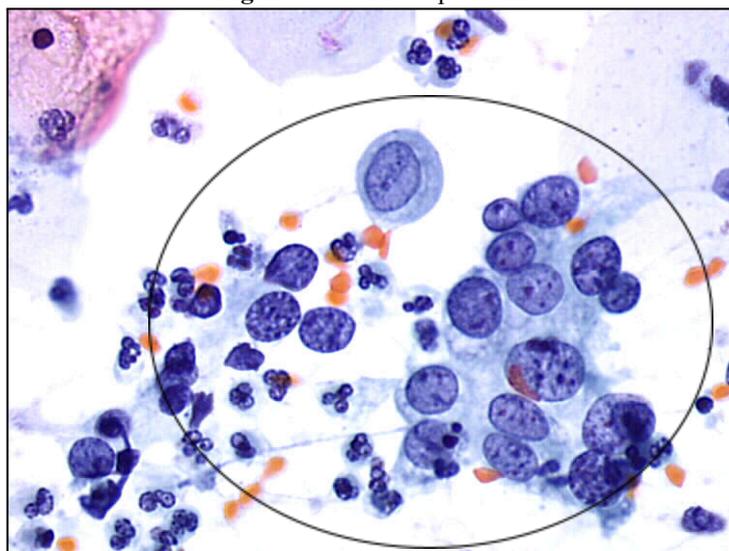


Fonte: Imagens cedidas pelo LPCM

Legenda: Fotomicrografias de amostras de citologia cervical convencional apresentando coilocitos (setas pretas). Coloração Papanicolau e aumento de 400X.

Além disso, mesmo sem a confirmação da infecção pelo HPV, o Sistema Bethesda aponta as características que devem ser observadas para a confirmação da lesão, sendo elas: células geralmente grandes, com citoplasma “maduro” e bem definido, núcleo aumentado, por vezes hiper cromático, irregularidade na membrana nuclear, os nucléolos geralmente não estão presentes ou não são visíveis devido à hiper cromasia, binucleações e multinucleações são frequentes, além do aumento da queratinização do citoplasma (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Nas lesões consideradas de alto grau (HSIL), após a integração do DNA viral, possuem como característica principal o acometimento das células mais profundas, mais imaturas, com a capacidade proliferativa preservada. A superexpressão de E6 e E7, e a consequente desregulação do ciclo celular, comprometem as camadas mais profundas do epitélio, evidenciando o avanço da lesão e, as células tipo HSIL (figura 5), possuem diferenças em comparação àquelas encontradas em LSIL, apresentam citoplasma mais imaturo, geralmente são menores, apresentam grau de irregularidade de borda nuclear mais acentuado, como também, aumento nuclear e hiper cromasia, com a cromatina variando de fina a grosseiramente granular, além da presença ou não de nucléolos (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 5 - Células tipo HSIL

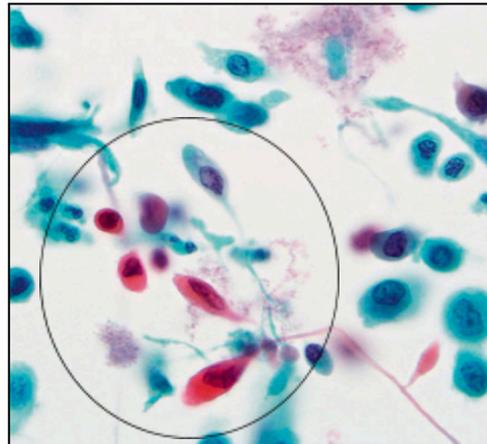
Fonte: (Frappart *et al.*, 2003)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como HSIL. Notam-se as células profundas (imaturas) e atípicas (círculo preto). Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

Com o avanço no desenvolvimento da lesão, tem-se o carcinoma de células escamosas (CCE), tumor epitelial invasivo que apresenta células em diferentes graus de diferenciação (figura 6). O Sistema Bethesda não subdivide o CCE, apenas para fins descritivos. Nesse momento, a lesão, antes considerada intraepitelial, extrapola os limites do epitélio e invade o estroma subjacente, as alterações visualizadas no desenvolvimento da lesão cervical possuem caráter cumulativo, ou seja, como o passar do tempo, aquelas características, ora consideradas leves, intensificam-se ao ponto da célula perder a sua identidade, tornando-se mais indiferenciada (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Entre os critérios apontados pelo Sistema Bethesda, tem-se a presença, majoritariamente, de células isoladas, com raros agrupamentos celulares, intenso pleomorfismo, tanto celular, quanto nuclear, com formas bizarras, alongadas e fusiformes, apresentando, por vezes, citoplasma densamente laranja e a cromatina grosseiramente granular e irregularmente distribuída e com presença de macronúcleos. Somado a isso, outro aspecto importante é a presença de diátese tumoral, composta por hemácias, hemossiderina, precipitado proteico e de fibrina, como também, necrose celular (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 6 - Carcinoma de células escamosas (CCE)

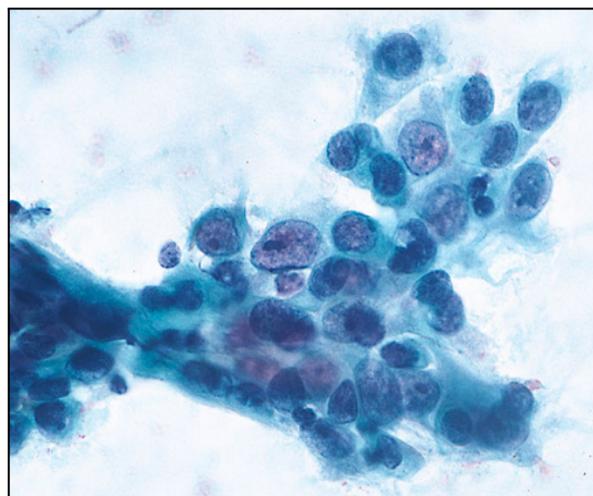


Fonte: (Frappart *et al.*, 2003)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como CCE, nota-se a presença de células bizarras, pleomórficas e queratinizadas (círculo preto). Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

No epitélio glandular, é necessário observar a presença de dois tipos celulares, as células endocervicais e as endometriais, ambas apresentando critérios específicos apontados pelos Sistema Bethesda. Contudo, apesar dos critérios citomorfológicos apresentarem diferenças, a classificação é similar. Em lesões de baixo grau, comparadas ao LSIL, tem-se a atipia de células glandulares (ACG) (figura 7), em células endocervicais, ocorrem agrupamentos celulares com sobreposição e/ou pseudoestratificação, aumento nuclear com discreta variação em sua forma, hipercromasia nuclear leve, com graus de irregularidade da cromatina, variando entre nenhuma a leve, além de apresentar nucléolos ocasionais (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 7 - Atipia de células glandulares (endocervicais)

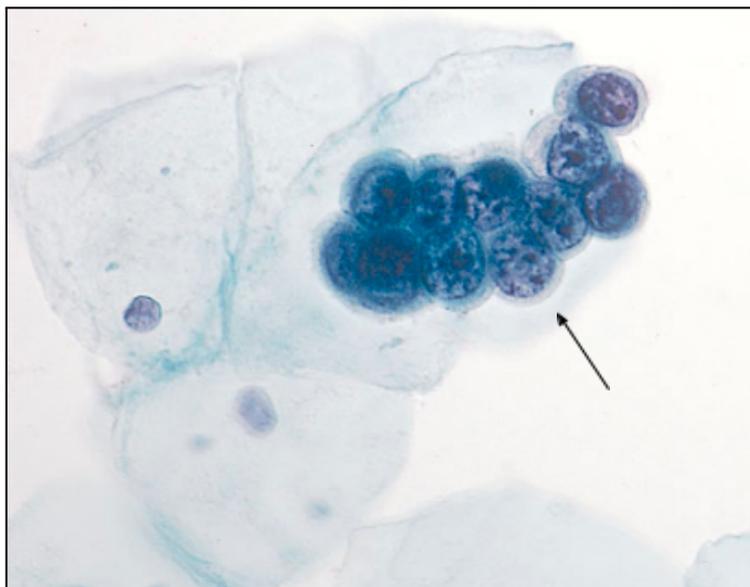


Fonte: Wilbur (2018)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como ACG endocervical. Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

Já nas células endometriais (figura 8), apesar da classificação ser a mesma, atipia de células glandulares (ACG), os critérios citomorfológicos são diferentes, sendo eles: agrupamentos pequenos, variando entre 5 e 10 células, núcleos levemente aumentados com discreta hiper cromasia, cromatina heterogênea, citoplasma escasso e bordas celulares irregulares (Nayar; Wilbur, 2017; Silva Neto, 2019; Wilbur, 2018).

Figura 8 - Atipia de células glandulares (endometriais)

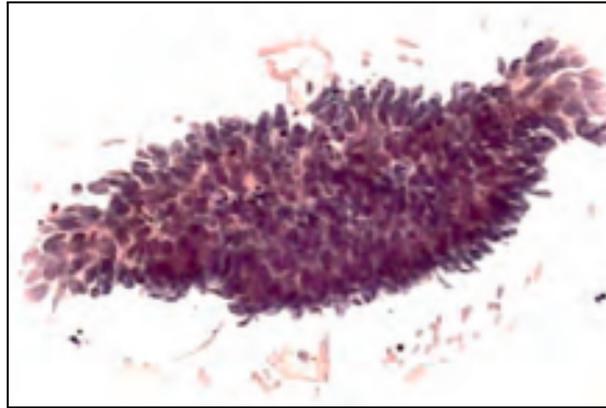


Fonte: Wilbur (2018)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como ACG endometrial (seta preta). Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

A classificação seguinte, atipia de células glandulares favorecendo neoplasia, encontra-se no limiar entre a atipia e o adenocarcinoma *in situ*, nesse tipo de lesão, os critérios de atipia estão presentes, porém não são únicos, notam-se elementos sugestivos do agravamento da lesão. Entre os critérios estabelecidos pelo Sistema Bethesda, tem-se: sobreposição ou pseudoestratificação dos agrupamentos celulares, núcleos aumentados, por vezes alongados e hiper cromáticos, cromatina grosseira e mitoses ocasionais, além disso, percebe-se, apesar de raras, a formação de figuras com aspecto de “roseta” ou “plumagem”, que sustentam o favorecimento da neoplasia (figuras 9 e 10) (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 9 - Células endocervicais em formação de plumagem

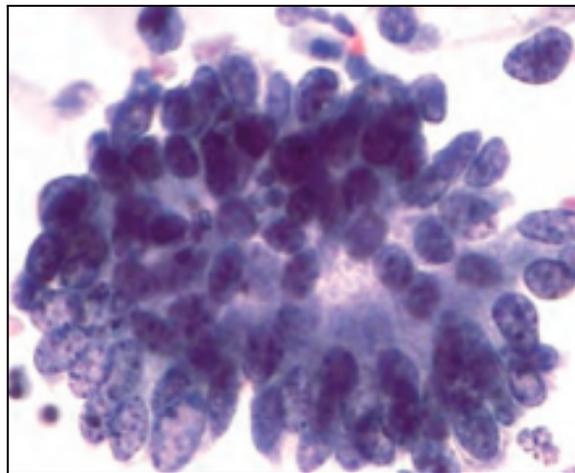


Fonte: Lima *et al.* (2012)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, com arranjo em forma de “plumagem”. Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

Contudo, em relação às células endometriais, o Sistema Bethesda não atribuiu a classificação em questão, visto que, as diferenças citomorfológicas que porventura apresentem-se no decorrer das lesões classificadas entre ACG e Adenocarcinoma endometrial, são praticamente imperceptíveis na citologia (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 10 - Células endocervicais em formação de roseta



Fonte: Lima *et al.* (2012)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, com o arranjo em forma de “roseta”. Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

Uma vez permanecendo o processo de desenvolvimento das lesões glandulares, tem-se o adenocarcinoma endocervical *in situ* (figura 11), considerada uma lesão de alto grau de caráter não invasivo, caracterizado pela presença de aglomerados celulares com pseudoestratificação, sobreposição nuclear e perda de polaridade. A presença de agrupamentos com arranjo nuclear em paliçada, com núcleos alongados e caudas

citoplasmáticas (plumagem), passam a ocorrer com maior frequência, como também, nucléolos pequenos ou discretos, mitoses e corpos apoptóticos. Outro aspecto envolvido nesse tipo de lesão é a ausência de diátese tumoral, acarretando um fundo limpo, apesar da possibilidade de detritos inflamatórios estarem presentes (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 11 - Adenocarcinoma endocervical *in situ*

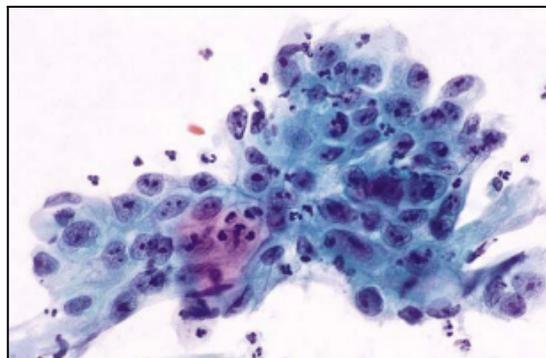


Fonte: Cibas; Ducatman (2020)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como ADC endocervical *in situ*, com arranjo em forma de "plumagem". Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

Por fim, têm-se as lesões consideradas invasivas, os adenocarcinomas endocervical e endometrial. Ambos possuem características que se sobrepõem a atipia de células glandulares, porém apresentam critérios adicionais que confirmam o grau invasivo da lesão. No primeiro (figura 12), há presença de células atípicas individuais, como também, agrupamentos tridimensionais e sinciciais - representado por células com escassez de citoplasma, mal delimitadas e núcleo com perda de polaridade, além disso, observam-se núcleos pleomórficos e cromatina irregular, como também, a presença de diátese tumoral necrótica (Nayar; Wilbur, 2017; Wilbur, 2018).

Figura 12 - Adenocarcinoma endocervical

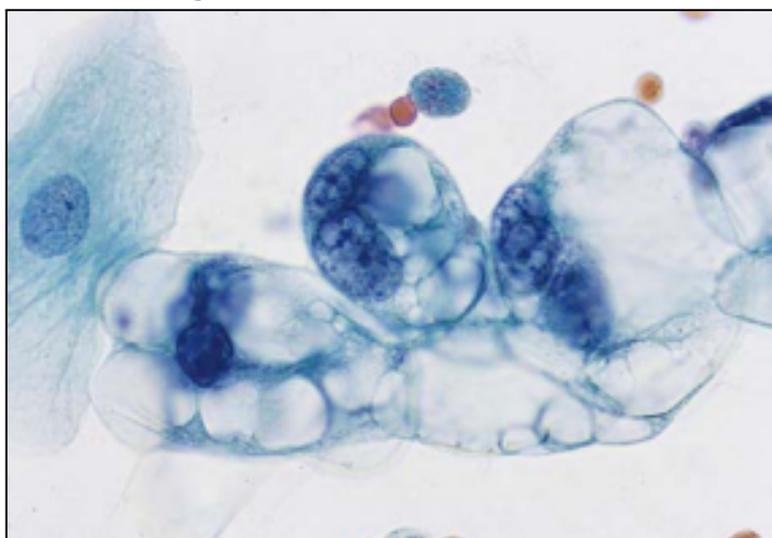


Fonte: Cibas; Ducatman (2020)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como ADC endocervical. Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

Em relação ao adenocarcinoma endometrial (figura 13), as células atípicas podem ocorrer individualmente ou em agrupamentos densos e compactos, com variação no tamanho nuclear e perda de polaridade, além de hipercromasia e distribuição irregular da cromatina. Os nucléolos geralmente são pequenos, porém tornam-se maiores com o agravamento da lesão. A diátese tumoral adquire um aspecto finamente granular e sua ocorrência é variável (Lima, 2012; Nayar; Wilbur, 2017; Silva Neto, 2019; Wilbur, 2018).

Figura 13 - Adenocarcinoma endometrial



Fonte: Cibas; Ducatman (2020)

Legenda: Fotomicrografia de amostra de citologia cervical em base líquida, classificada como ADC endometrial. Coloração de Papanicolau e aumento de 400X.

2.2.2 Critérios histopatológicos

Considerada o padrão ouro para o diagnóstico do câncer cervical, a biópsia é um procedimento no qual um fragmento de tecido ou órgão é retirado para análise anatomopatológica (Albuquerque, 2016).

No geral, a classificação histopatológica baseia-se na observação de características relativas à maturação, diferenciação, estratificação das células e alterações nucleares, além disso, a proporção de células maduras, diferenciadas e organizadas na extensão do epitélio, também é considerado um critério para análise (Sellors; Sankaranarayanan, 2004).

A partir de 1968, a classificação desenvolvida por Ralph Richart, passou a ser utilizada para identificar uma série de atipias celulares limitadas ao epitélio, ou seja, não invasivas. O sistema foi dividido em classes ou graus (quadro 4), denominados de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Sellors; Sankaranarayanan, 2004).

Quadro 4 - Terminologia NIC

Terminologia	Característica
- NIC-I	- Displasia leve
- NIC-II	- Displasia moderada
- NIC-III	- Displasia severa e carcinoma <i>in situ</i>

Fonte: Adaptado de Sellors; Sankaranarayanan (2004)

Atualmente, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, adota uma classificação revisada em 2001 (quadro 5), onde correlaciona o grau de displasia e/ou a discariose presentes no epitélio (Sellors; Sankaranarayanan, 2004).

Quadro 5 - Terminologia atual NIC

Terminologia atual	Correspondência	Característica
- NIC de baixo grau	NIC-I	Displasia leve ou discariose leve
- NIC de alto grau	NIC-II	Displasia moderada ou discariose moderada
- NIC de alto grau	NIC-III	Displasia grave ou discariose grave
- NIC de alto grau	Carcinoma <i>in situ</i>	
- Carcinoma invasivo	Carcinoma invasivo	

Fonte: Adaptado de Sellors; Sankaranarayanan (2004)

Em situação de normalidade, o epitélio apresenta-se bem delimitado, do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado, que se estende a partir das paredes da vagina, incluindo o canal cervical revestido por epitélio simples cilíndrico (figura 14-A) (Ross; Pawlina; Barnash, 2009).

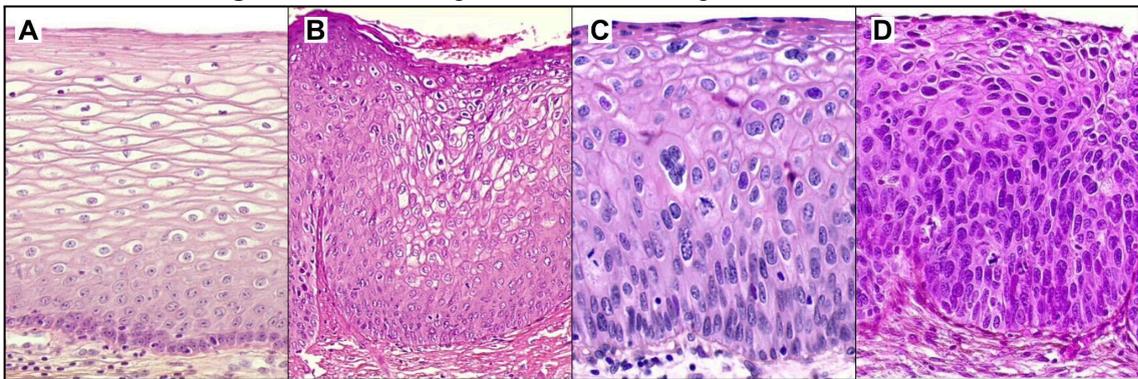
Nas lesões consideradas de baixo grau (NIC-I), o epitélio apresenta uma maturação próxima da normalidade, as alterações restringem-se ao terço inferior, próximo à membrana basal (Figura 14-B). Nesse momento, a infecção pelo HPV está na fase produtiva, devido a isso, pode-se observar a presença de coilócitos em toda a extensão do epitélio, além de alterações nucleares e citoplasmáticas leves, que incluem discreta atipia nuclear, com ocorrência de hiper Cromasia e mitoses ocasionais (Sellors; Sankaranarayanan, 2004).

Na sequência, as lesões consideradas de alto grau, que incluem NIC-II e NIC-III, apresentam como características, a intensificação das alterações celulares displásicas. Em

NIC-II (figura 14-C), restritas aos dois terços inferiores do epitélio, com atípica nuclear mais pronunciada, além de figuras de mitose vistas com maior frequência (Sellors; Sankaranarayanan, 2004).

Nas lesões consideradas como NIC-III (figura 14-D), percebe-se a ausência de estratificação do epitélio ou, quando presente, apenas na parte superficial, evidenciando o comprometimento da diferenciação celular, bem como, pronunciada atípia nuclear e citoplasmática, com presença de figuras de mitose atípicas em toda a extensão do epitélio (Sellors; Sankaranarayanan, 2004).

Figura 14 - Fotomicrografia de cortes histológicos do colo do útero



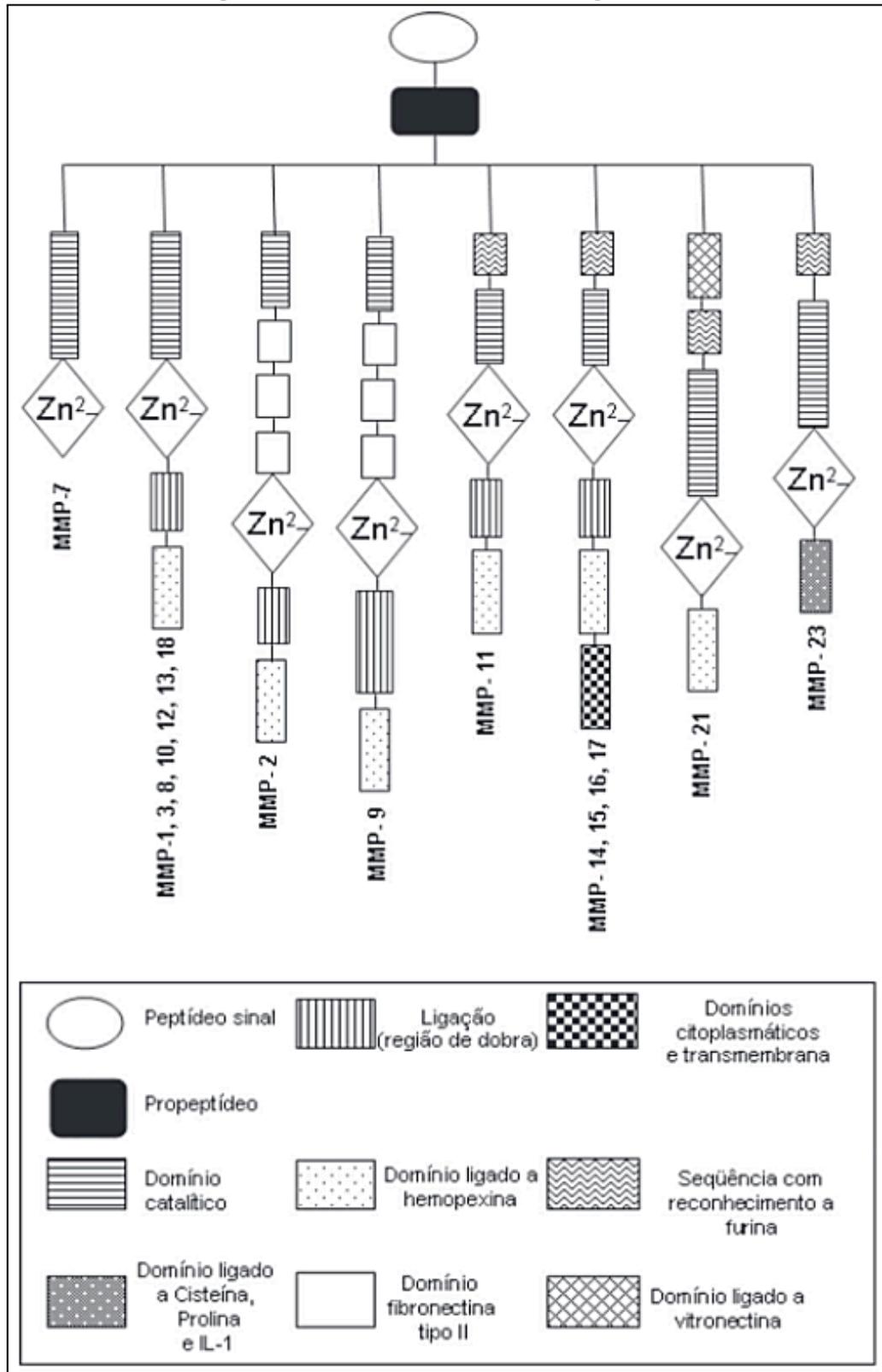
Fonte: Frappart *et al.* (2003)

Legenda: (A) epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado normal, (B) displasia leve (NIC-I), (C) displasia moderada (NIC-II) e (D) displasia severa (NIC-III). Coloração HE e aumento de 400X.

2.3 METALOPROTEINASES DE MATRIZ

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de zinco (figura 15), responsáveis pela remodelação tecidual e degradação da matriz extracelular (MEC) em resposta a diversos estímulos, por exemplo, na embriogênese, morfogênese tecidual, recuperação tecidual, em processos inflamatórios como artrite, processos neoplásicos, entre outros (Liu *et al.*, 2018). As MMPs são secretadas por fibroblastos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, osteoblastos, células endoteliais, linfócitos e, principalmente, células tumorais (Araújo *et al.*, 2011; Ivković *et al.*, 2022).

Figura 15 - Estrutura das diferentes metaloproteínas



Fonte: Araújo *et al.* (2011)

Legenda: A figura representa, esquematicamente, a estrutura das metaloproteínas, com as regiões de ligação e domínio catalítico.

Até o momento, 24 MMPs são conhecidas e a depender do substrato que atuam (quadro 6), são classificadas em colagenases, gelatinases, estromelisinases e matrilisinases (Niland; Riscanevo; Eble, 2021). Pertencente ao grupo das colagenases e objeto do presente estudo, a MMP-14 atua sobre o colágeno do tipo I e possui um intrincado papel na progressão tumoral e metástase, além disso, é capaz de ativação própria e de outras MMPs (figura 16), por exemplo, 13, 8 e 2 que por sua vez, ativam outras em sequência, com isso contribuindo para a sustentação de um microambiente propício para invasão do tecido adjacente (Cardeal *et al.*, 2012).

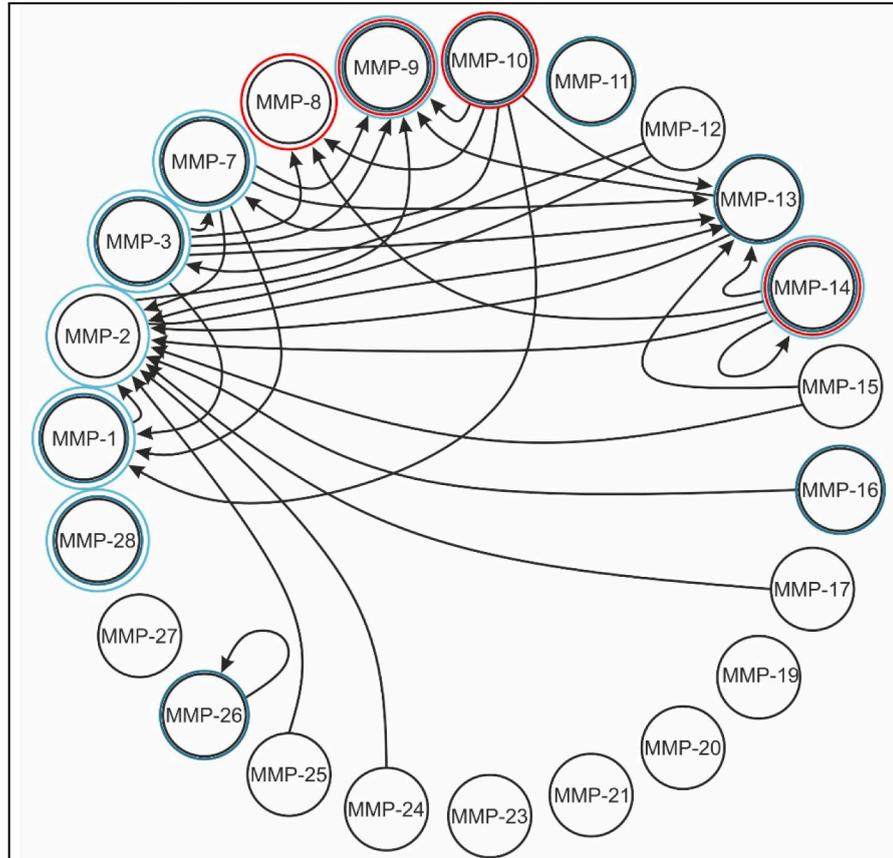
Quadro 6 - Tipos de metaloproteinases e seus respectivos substratos

MMP	Sinônimo	Substrato
1	Colagenase 1	Colágeno tipo I
2	Gelatinase A	Proteoglicanos, colágenos IV, V, VII e X, fibronectina
3	Estromelisinase 1	Proteoglicanos, colágeno X, XI, pró-colágeno
7	Matrilisinase 1	Fibronectina, plasminogênio
8	Colagenase 2	Proteoglicanos
9	Gelatinase B	Plasminogênio, colágeno IV
10	Estromelisinase 2	Estromelisinase 1
11	Estromelisinase 3	IGFBP-1 (proteína de ligação da somatomedina)
12	Elastase de macrófago	Plasminogênio, elastina, colágeno IV, fibronectina
13	Colagenase 3	Colágeno tipo I
14	MT1-MMP	CD44, colágeno tipo I
15	MT2-MMP	Transglutamina de superfície
16	MT3-MMP	Transglutamina de superfície
17	MT4-MMP	Fibrina
18	Colagenase 4	Colágeno tipo I

Fonte: Adaptado de Araújo *et al.* (2011)

Apesar das MMPs participarem fisiologicamente de diversas funções do organismo, seus níveis permanecem aquém daqueles identificados em neoplasias, os genes E5, E6 e E7 do HPV participam diretamente desse estímulo e, a superexpressão das MMPs, favorecem a modificação celular, contribuindo para a aquisição de características presentes em cânceres, como proliferação descontrolada, angiogênese, invasão e metástase (Mendonça *et al.*, 2022).

Figura 16 - Ativação das MMPs expressas em humanos



Fonte: Adaptado de (Niland; Riscanevo; Eble, 2021)

Legenda: A figura representa, esquematicamente, as relações de ativação entre as diferentes metaloproteinases.

Concomitantemente, De Almeida *et al.* (2022), sinalizam a importância de estudos relativos à participação das MMPs em processos neoplásicos, em particular a MMP-14, muito pelo seu papel ativador de outras MMPs, como também, pela possibilidade da sua participação nos momentos iniciais da lesão, além da ativação da MMP-2 que, conseqüentemente, ativará a MMP-9, ambas atuando no momento imediatamente anterior a invasão e permanecendo superexpressas em estágios mais avançados, sendo possível identificar, inclusive, imunorreação em tecido estromal.

2.4 PROTEÍNA p16^{INK4a}

A proteína p16^{INK4a}, codificada pelo gene CDKN2A⁷ (do inglês, cyclin dependent kinase inhibitor 2A), além de importante supressor tumoral, desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular, atuando como um inibidor das cinases dependentes de ciclina (CDKs) 4 e 6. Quando fosforilada, a pRb libera o fator de transição E2F e, conseqüentemente, promove a transição celular da fase G1 para a fase S (Zhang *et al.*, 2023).

Essa regulação é essencial para controlar a progressão do ciclo celular, prevenindo a proliferação celular descontrolada. Em células normais, a expressão de p16^{INK4a} é baixa, porém, em situações de estresse celular ou transformação maligna, como na infecção pelo HPV, sua expressão pode ser significativamente aumentada. No câncer cervical, a superexpressão de p16^{INK4a} está frequentemente associada à integração do DNA viral do HPV ao genoma da célula hospedeira, o que leva à desregulação do ciclo celular e à progressão tumoral (Zhang *et al.*, 2023).

A detecção da p16^{INK4a} tem sido utilizada como um marcador imuno-histoquímico para auxiliar no diagnóstico e prognóstico do câncer cervical. Tem-se demonstrado que a superexpressão de p16^{INK4a} está correlacionada com a presença de lesões de alto grau, como NIC-2, NIC-3 e CCE. Essa superexpressão reflete a inativação da pRb pela oncoproteína E7 do HPV, como consequência desse comprometimento, a p16^{INK4a} acumula-se na célula como um mecanismo compensatório, diferentemente do que ocorre em células saudáveis, onde não há acúmulo ou sua expressão é relativamente baixa (Hosseini *et al.*, 2023). Portanto, a imunexpressão de p16^{INK4a} é considerada um indicador indireto da atividade oncogênica do HPV e tem sido incorporada em diretrizes clínicas para melhorar a precisão diagnóstica (Ishikawa *et al.*, 2021).

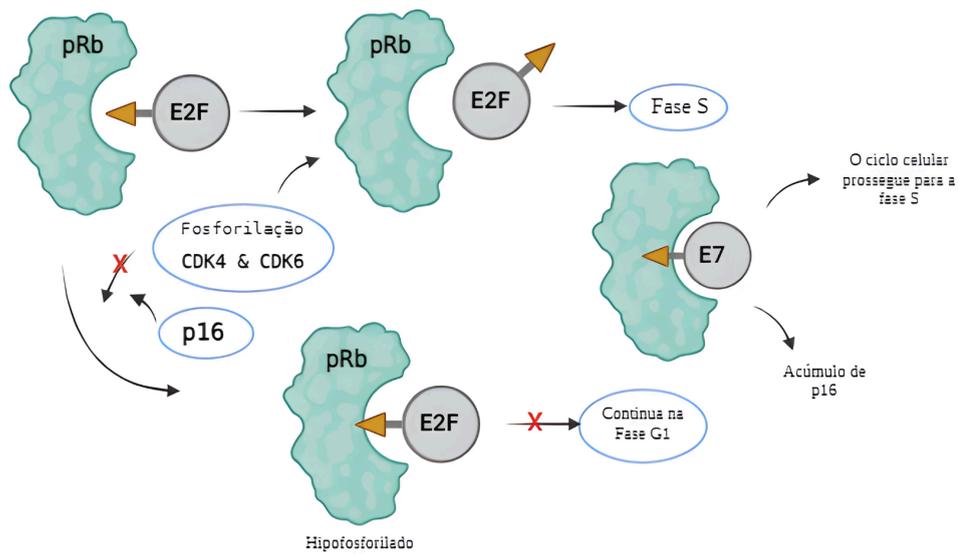
Além de seu papel diagnóstico, a p16^{INK4a} também tem sido investigada como um marcador prognóstico no câncer cervical. Pacientes com tumores que apresentam alta expressão de p16^{INK4a} tendem a ter uma melhor resposta ao tratamento, especialmente em casos de CCE. Isso pode estar relacionado ao fato de que a sua superexpressão está associada a tumores dependentes da via do HPV, que são mais sensíveis à radioterapia e quimioterapia. No entanto, em subtipos menos comuns de câncer cervical, como o adenocarcinoma, o papel da p16^{INK4a} ainda é menos claro e requer mais investigação (Ishikawa *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a superexpressão de p16^{INK4a} possui potencial para se tornar um biomarcador complementar na triagem primária, sendo utilizado como ferramenta auxiliar na

⁷ Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A

identificação de lesões iniciais do tipo LSIL ou NIC-1 em biópsias cervicais, como também em outros cânceres relacionados ao HPV, por exemplo, carcinomas orofaríngeos (Song *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2023).

Figura 17 - Mecanismo de ação da p16^{INK4a}



Fonte: O autor, criado com *BioRender* (2025)

Legenda: A figura representa, esquematicamente, a ação da p16 e a interferência da oncoproteína E7 na regulação do ciclo celular.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão da metaloproteinase de matriz-14 (MMP-14) e p16^{INK4a}, por meio da imuno-histoquímica, em lesões precursoras e no câncer cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as amostras segundo os laudos citológicos e histológicos;
- Investigar a associação entre a expressão imuno-histoquímica da MMP-14 e p16^{INK4a}, com as amostras cervicais e os dados citológicos e histológicos;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica da MT1-MMP e p16^{INK4a} com o grau de desenvolvimento das lesões precursoras e de câncer cervical.

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal, desenvolvido no âmbito do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia (mestrado) da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, sendo utilizadas amostras de biópsia cervical emblocadas em parafina, oriundas do serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFPE. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), bem como a análise das lâminas confeccionadas, visando a identificação da relação entre a expressão da MMP-14 e a p16^{INK4a} com os estágios de desenvolvimento do câncer cervical.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O desenvolvimento da pesquisa foi realizado no Laboratório de Pesquisas Celulares e Moleculares – LPCM, localizado no Laboratório Central – Labcen do Centro de Biociências – CB da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho obedeceu aos preceitos éticos da Resolução 466/12 ou 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), onde foram avaliados os potenciais riscos e benefícios, como também, os requisitos descritos na Resolução 196 de 1996, sendo apreciado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP), sob o CAAE n.º 74798423.0.0000.5208.

Em relação ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), não se fez necessário no presente trabalho, visto que, tratou-se de pesquisa que utilizou amostras de arquivo, além disso, por se tratar de Hospital de referência, localizado em Recife-PE, atendendo a pacientes encaminhados de diversas regiões/municípios do estado, tornou-se inviável a captação dos respectivos consentimentos. Contudo, toda e qualquer informação relativa aos pacientes foi e será mantida sob total sigilo.

4.3.1 Riscos e benefícios

A resolução n.º 466/12, aborda e regulamenta as diretrizes inerentes ao desenvolvimento de pesquisas envolvendo seres humanos. Neste sentido, o presente trabalho apresenta riscos mínimos aos pacientes envolvidos na pesquisa, uma vez que, não houve participação direta dos mesmos em qualquer etapa.

Porém, cabe salientar que, a possibilidade, apesar de mínima, de vazamento de qualquer tipo de informação acerca dos envolvidos existe, a qual foi minimizada pela restrição de acesso de qualquer natureza, por exemplo, aos dados obtidos dos prontuários, de pessoas além do orientador e do pesquisador, o qual manterá os dados armazenados em computador pessoal e protegido com acesso através da digital. Faz-se necessário destacar também que, em relação ao processamento imuno-histoquímico, existe risco devido à manipulação de substâncias carcinogênicas (Diaminobenzidina), o qual foi minimizado pelo uso de proteção facial (óculos e máscara), luvas e vestuário de proteção, além de precauções pós-manuseio, como a lavagem cuidadosa das mãos.

Em relação aos benefícios, apesar de indiretos, são promissores, uma vez que, o estabelecimento da relação entre a superexpressão da MT1-MMP e o desenvolvimento das lesões cervicais, contribuirá, não apenas para a compreensão do microambiente tumoral, como também, para estabelecer um biomarcador utilizado para auxiliar na conclusão diagnóstica, avaliação prognóstica e escolha terapêutica pelo profissional médico. “5 anos”

4.4 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de biópsia cervical arquivadas no serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, autorizado pela chefia do serviço, Dra. Arione Vieira.

O cálculo amostral foi obtido através da seguinte fórmula: $n = N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1-p) / Z^2 \cdot p \cdot (1-p) + e^2 \cdot N - 1$ (n: amostra calculada, N: população, Z: variável normal, p: real probabilidade do evento, e: erro amostral), onde, após aplicar o percentual mínimo para o Estado de Pernambuco – 13% (INCA, 2022), o número de indivíduos que compõem a pesquisa (100.000) e o erro amostral de 5%, obteve-se um $n = 174$. Vale salientar que o resultado do cálculo anterior refere-se a um valor de 'n' recomendado, e não obrigatório.

Em relação à escolha dos blocos de parafina, foi realizado o levantamento através dos prontuários para a seleção dos casos de interesse. Em seguida, cada bloco foi cortado em

micrótomo, na espessura de 4 μm , sendo confeccionada uma lâmina para cada bloco, distribuídas conforme apresentado no quadro 7.

Quadro 7: Distribuição das lâminas confeccionadas.

Grau da lesão	Quantidade de blocos	Lâminas por biomarcador
NIC-1	32	MMP-14 (16) / p16 (16)
NIC-2	30	MMP-14 (15) / p16 (15)
NIC-3	35	MMP-14 (16) / p16 (19)
CCE	29	MMP-14 (15) / p16 (14)

Fonte: O autor (2024)

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Amostras de biópsia, emblocadas em parafina;
- Com diagnóstico conclusivo para LSIL, HSIL, Carcinoma *in situ*, CCE ou NIC-I, NIC-II e NIC-III;
- Blocos com data de arquivamento superior a 2018.

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Blocos arquivados antes de 2018;
- Blocos que possuam movimentação em seus respectivos prontuários entre 2021 e 2023;
- Blocos com quantidade de amostra considerada insuficiente para o corte.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

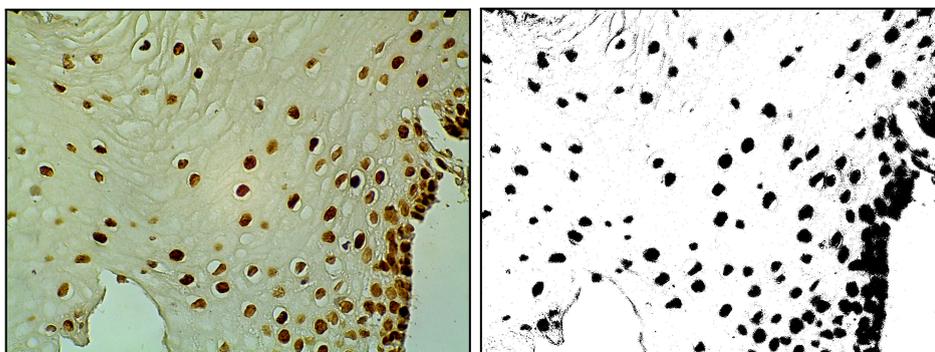
A imuno-histoquímica foi realizada para detectar os alvos específicos, MMP-14 e p16^{INK4a}. Foram realizados cortes de 4 μm de espessura a partir de blocos parafinados contendo fragmentos de biópsias encaminhadas para análise histopatológica, sendo estes cortes repousados em lâminas silanizadas para melhor aderência do material. Foram utilizados anticorpos monoclonais de rato contra as proteínas MT1-MMP/IGG1 e p16^{INK4a}, produzidos pela *Santa Cruz Biotechnology* (Texas, EUA), com titulação de 1:100.

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão histológica, por 15 min, com as lâminas mergulhadas em tampão citrato (pH 6,0), sendo resfriadas até a temperatura de 37 °C. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando o bloqueador específico do kit de detecção (polímero / peroxidase / anti-camundongo / *plus* IGG) fabricado pela *Vector Laboratories* (Newark - CA, EUA), após o tempo recomendado pelo fabricante, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por um período de 12h, acondicionadas em câmara úmida e escura e refrigeradas à temperatura de 4 °C. Na sequência, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato - PBS (pH 7,2) e incubadas com anticorpo secundário específico contra anticorpos de rato, presente no kit de detecção, logo após, as lâminas foram incubadas com solução cromógena de 3,3 - diaminobenzidina (DAB), lavadas com água destilada e contra-coradas com hematoxilina, desidratadas gradualmente em álcool (70°, 80°, 90° e 100°) e montadas com lamínula e *Entellan*®.

4.8 ANÁLISE DAS LÂMINAS

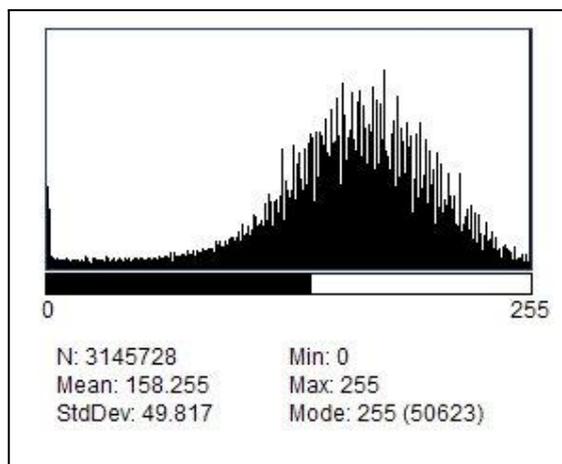
A captura das imagens foi realizada utilizando microscópio da marca Kasvi (K55-OIT), em aumentos de 100 e 400×, com câmera acoplada com sensor CMOS (1/2.33" 16MP HDMI FullHD 100×). A análise da intensidade da marcação imunorreativa foi realizada através do *software ImageJ*, aplicando-se a ferramenta *color deconvolution*, onde é possível gerar uma imagem em 8 bits (figura 18) e a partir dela, obter-se a intensidade dos *pixels* da área previamente marcada pelo DAB, com a geração de histograma (figura 19) e o valor da mensuração de intensidade.

Figura 18 - Imagem gerada em 8 bits pelo *ImageJ*



Fonte: o autor (2025)

Legenda: Na esquerda, imagem original e a direita, imagem gerada em 8 bits pelo *ImageJ*, revelando os núcleos marcados pelo DAB (castanhos) em preto. Aumento de 100×.

Figura 19 - Histograma gerado pelo *ImageJ*

Fonte: o autor (2025)

Legenda: Histograma gerado pelo *ImageJ*, apresentando a mensuração da intensidade da imunorreação.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software Jamovi 2.3.28* para *Windows 64 bits*. Para análise da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o de comparações múltiplas de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Para as correlações entre as intensidades de imunorreação dos biomarcadores e os respectivos graus de lesão, foram utilizadas as correlações de Spearman e Pearson. Para a análise das probabilidades de ocorrência foi utilizada a regressão logística e, por fim, o teste ROC, para avaliar a sensibilidade em comparação a especificidade de cada biomarcador frente aos graus de lesão. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$.

5 ARTIGO ORIGINAL

EXPRESSÃO DA METALOPROTEINASE-14 E p16^{INK4a} EM LESÕES PRECURSORAS E CÂNCER CERVICAL: UMA ABORDAGEM IMUNO-HISTOQUÍMICA

Emmanuel Nóbrega Travassos de Arruda¹, Gabriel José Mattos Leão², Helbert Gean da Silva³, Isa Cordeiro da Silva¹, Julliano Mateus de Lima Maux³, Maria Eduarda Tenório de Araújo Silva⁴, Romildo Luciano da Silva⁵, Jacinto da Costa Silva Neto⁶

1. Biomédico (a), Mestre em Morfotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco;
2. Biomédico, Mestrando em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco;
3. Biomédico, Mestre em Saúde Translacional, Universidade Federal de Pernambuco;
4. Graduanda em Biomedicina, Universidade Federal de Pernambuco;
5. Biomédico, Mestre em Morfotecnologia, Hospital das Clínicas - UFPE/EBSERH;
6. Biomédico, Prof. Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco.

RESUMO

Mundialmente, o câncer cervical ainda é um grande desafio para a saúde pública, em 2022 foram notificados 661.021 novos casos, resultando em 348.189 mortes. Existem dois tipos principais de câncer de colo do útero, sendo o mais comum o carcinoma de células escamosas (CCE), seguido pelo adenocarcinoma endocervical (ADC). O desenvolvimento dessas neoplasias está estreitamente relacionado ao papilomavírus humano (HPV), exigindo uma infecção persistente e prolongada por subtipos de alto risco, como HPV16 e HPV18. Atualmente, o rastreio é realizado por meio da citologia oncológica e encaminhado, caso necessário, para colposcopia e biópsia. Contudo, ainda ocorre um número elevado de resultados falso-positivos e falso-negativos, necessitando o estabelecimento de biomarcadores capazes de aumentar a precisão do diagnóstico. Entre as moléculas com potencial para se tornar um biomarcador, tem-se a metaloproteinase-14 (MMP-14) da família das metaloproteinases de matriz, bem como p16^{INK4a}, proteína supressora tumoral que desempenha um importante papel no ciclo celular. Foram utilizadas amostras de biópsia cervical arquivadas no serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Por meio da imuno-histoquímica avaliou-se a expressão da MMP-14 e p16^{INK4a} em lesões precursoras e CCE. Os resultados demonstraram que o perfil das pacientes é constituído, na sua maioria, de mulheres pardas, com média de 39 anos à época do diagnóstico e início da atividade sexual aos 17 em média. Houve variação na intensidade de expressão entre os biomarcadores, a p16^{INK4a} apresentou intensidade imunorreativa gradualmente crescente e a MMP-14, variável e decrescente. Com base nos testes estatísticos realizados, observou-se que tanto a p16^{INK4a} quanto a MMP-14 apresentaram boa sensibilidade, sugerindo seu uso na triagem primária, visto que são capazes de identificar casos positivos com maior segurança. Vale ressaltar que o uso individualizado tanto da p16^{INK4a} como da MMP-14 não é recomendado, já que seus níveis de expressão são influenciados por processos inflamatórios agudos ou crônicos. Portanto, a aplicação desses biomarcadores no contexto das lesões cervicais é promissora, porém são necessários estudos que possam diferenciar expressões fisiológicas daquelas encontradas em processos neoplásicos, provocados ou não pelo HPV.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica; Papillomavirus humano; Neoplasia do colo do útero; Metaloproteinase-14; p16INK4a

ABSTRACT

Globally, cervical cancer remains a significant public health challenge. In 2022, there were 661,021 new cases reported, resulting in 348,189 deaths. There are two main types of cervical cancer, with the most common being squamous cell carcinoma (SCC), followed by endocervical adenocarcinoma (ADC). The development of these neoplasms is closely linked to human papillomavirus (HPV), requiring persistent and prolonged infection by high-risk subtypes such as HPV16 and HPV18. Currently, screening is conducted through oncotic cytology and, if necessary, referred for colposcopy and biopsy. However, there is still a high number of false-positive and false-negative results, necessitating the establishment of biomarkers capable of increasing diagnostic accuracy. Among the molecules with potential to become biomarkers are matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) from the matrix metalloproteinase family, as well as p16INK4a, a tumor suppressor protein that plays an important role in the cell cycle. Archived cervical biopsy samples from the Pathological Anatomy Service of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco were used. Immunohistochemistry was used to evaluate the expression of MMP-14 and p16INK4a in precursor lesions and SCC. The results showed that the patient profile predominantly consisted of mixed-race women, with an average age of 39 at the time of diagnosis and an average age of 17 at the onset of sexual activity. There was variation in the intensity of expression between the biomarkers, with p16INK4a showing a gradually increasing immunoreactive intensity and MMP-14 showing a variable and decreasing intensity. Based on the statistical tests conducted, it was observed that both p16INK4a and MMP-14 exhibited good sensitivity, suggesting their use in primary screening, as they are capable of identifying positive cases more reliably. It is important to note that the individualized use of either p16INK4a or MMP-14 is not recommended, as their expression levels are influenced by acute or chronic inflammatory processes. Therefore, the application of these biomarkers in the context of cervical lesions is promising, but further studies are needed to differentiate physiological expressions from those found in neoplastic processes, whether or not caused by HPV.

Keywords: Immunohistochemistry; Human Papillomavirus; Cervical Neoplasm; Metalloproteinase-14; p16INK4a

INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer cervical ainda é um grande desafio para a saúde pública, em 2022, foram notificados 661.021 novos casos, resultando em 348.189 mortes, sendo o 8º mais incidente e o 9º em número de óbitos (Bray *et al.*, 2024). Nos países em desenvolvimento, alguns aspectos contribuem para uma taxa de mortalidade ascendente, 19,3 por 100.000 habitantes, entre elas destacam-se as condições socioeconômicas desfavoráveis, dificuldades no acesso aos serviços de saúde e, além disso, a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), sendo esta uma das infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) mais comuns e, ainda, relacionada ao desenvolvimento do câncer cervical, com maior probabilidade associada ao início da atividade sexual de maneira precoce e falha na cobertura vacinal (Ntanasis-Stathopoulos *et al.*, 2020; Mekonnen; Mittiku, 2023).

Uma vez estabelecida a infecção pelo HPV, bem como a sua persistência, dois tipos principais de câncer de colo do útero podem ter início, o mais comum, o carcinoma de células escamosas (CCE), seguido pelo adenocarcinoma endocervical (ADC) (Bray *et al.*, 2024). O desenvolvimento dessas neoplasias está estreitamente relacionado ao HPV, tendo como subtipos mais prevalentes o HPV16 e HPV18, responsáveis por mais de 80% dos casos de câncer cervical (Ma; Yang, 2021). O processo de infecção pelo HPV envolve, principalmente, duas proteínas oncogênicas, E6 e E7, que, de forma sinérgica, podem "imortalizar" a célula hospedeira, permitindo que a divisão celular ocorra continuamente (Zur Hausen, 2002).

Entretanto, não são todas as infecções pelo HPV que culminam em câncer, geralmente, o sistema imunológico consegue debelar a infecção e, quando associado a um rastreamento eficaz, as taxas de cura são significativamente altas. No Brasil, recomenda-se que o início do rastreamento seja a partir dos 25 anos, com repetições anuais ou a cada três anos, dependendo do resultado do exame citológico (Silva, 2016). Porém, apesar da importância do rastreamento, ainda é possível observar um número elevado de resultados falso-positivos e falso-negativos, necessitando o estabelecimento de biomarcadores capazes de aumentar a precisão do diagnóstico, além de fornecer informações a respeito da progressão da lesão (Albuquerque, 2016).

Entre as moléculas com potencial para se tornar um biomarcador, tem-se a família das metaloproteinases de matriz, em especial, a metaloproteinase-14 (MT1-MMP ou MMP-14). No geral, as metaloproteinases possuem como principal função a degradação da matriz extracelular (MEC), remodelando o tecido conjuntivo e, ainda, atuando em

processos inflamatórios, sendo divididas em subfamílias, entre elas as colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, além das de membrana ou transmembrana celular (Chen *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2022). Estudos envolvendo tecido cervical sugerem que as metaloproteinases podem indicar a progressão precoce do tumor, devido ao seu aumento gradual em lesões pré-invasivas ou precursoras. (Vieira *et al.*, 2022).

Particularmente, a MMP-14 atua degradando a matriz extracelular e remodelando o tecido conjuntivo, além de contribuir para a perda de adesão celular, angiogênese tumoral e transição epitelial-mesenquimal, influenciando significativamente o microambiente onde a célula tumoral está presente (Chen *et al.*, 2021). Porém, sua expressão e de outras metaloproteinases é dependente de regulação, sendo esta realizada pela expressão de inibidores do tipo TIMPs⁸ (do inglês, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), sendo de quatro tipos (TIMP-1, 2, 3 e 4) e a RECK⁹ (*Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*), que participa de diversos processos fisiológicos, incluindo angiogênese, embriogênese e manutenção da MEC (Herbster *et al.*, 2021).

Somada à expressão das metaloproteinases de matriz, tem-se a p16^{INK4a}, proteína supressora tumoral que desempenha um importante papel no ciclo celular. A partir da sua superexpressão é possível estabelecer uma relação entre a intensidade da imunorreação e o grau de disfunção do ciclo celular em diversas neoplasias, em particular nas lesões associadas ao HPV, pois a sua presença indica o comprometimento funcional da via da proteína do retinoblastoma (pRb) promovida pela expressão da oncoproteína E7 (Mandal *et al.*, 2020).

Dessa forma, avaliar a expressão da MMP-14, bem como da p16^{INK4a} e, ainda, correlacionar a expressão imuno-histoquímica com os diferentes graus de lesão cervical, torna-se essencial para o entendimento da progressão e do microambiente tumoral, além de contribuir para a conclusão diagnóstica, avaliação prognóstica e tomada de decisão terapêutica.

MATERIAIS E MÉTODO

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal, desenvolvido no âmbito do Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia (mestrado) da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, sendo utilizadas amostras de biópsia cervical emblocadas em parafina,

⁸ Inibidor tecidual de metaloproteinase.

⁹ Proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal.

oriundas do serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UFPE. A técnica de imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), bem como a análise das lâminas confeccionadas, visando a identificação da relação entre a expressão da MMP-14 e a p16^{INK4a} com os estágios de desenvolvimento do câncer cervical.

O presente trabalho obedeceu aos preceitos éticos da Resolução 466/12 ou 510/16 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), onde foram avaliados os potenciais riscos e benefícios, como também, os requisitos descritos na Resolução 196 de 1996, sendo apreciado pelo Comitê de Ética em pesquisa (CEP), sob o CAAE n.º 74798423.0.0000.5208.

Imuno-Histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada para detectar os alvos específicos, MMP-14 e p16^{INK4a}. Foram selecionados 130 blocos parafinados contendo fragmentos de biópsias encaminhadas para análise histopatológica, os cortes de cada bloco foram realizados na espessura de 4 µm, sendo estes repousados em lâminas silanizadas para melhor aderência do material. O método utilizado foi o livre de biotina e conjugado com peroxidase de rábano (do inglês, *Horseradish Peroxidase - HRP*). Foram utilizados anticorpos monoclonais de rato contra as proteínas MT1-MMP/IGG1 e p16^{INK4a}, produzidos pela *Santa Cruz Biotechnology* (Texas, EUA), com titulação de 1:100.

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão histológica, por 15 min, com as lâminas mergulhadas em tampão citrato (pH 6,0), sendo resfriadas até a temperatura ambiente. Em seguida, a peroxidase endógena foi bloqueada utilizando o bloqueador específico do kit de detecção (polímero / peroxidase / anti-camundongo / *plus* IGG) fabricado pela *Vector Laboratories* (Newark - CA, EUA), após o tempo recomendado pelo fabricante, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por um período de 12h, acondicionadas em câmara úmida e escura e refrigeradas à temperatura de 4 °C. Na sequência, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato - PBS (pH 7,2) e incubadas com anticorpo secundário específico contra anticorpos de rato, presente no kit de detecção, logo após, as lâminas foram incubadas com solução cromógena de 3,3 - diaminobenzidina (DAB), lavadas com água destilada e contra-coradas com hematoxilina, desidratadas gradualmente em álcool (70°, 80°, 90° e 100°) e montadas com lamínula e *Entellan*®.

A captura das imagens foi realizada utilizando microscópio da marca Kasvi (K55-OIT), em aumentos de 100 e 400X, com câmera acoplada com sensor CMOS (1/2.33”

16MP HDMI FullHD 100X). A análise da intensidade da marcação imunorreativa foi realizada através do *software ImageJ*, aplicando-se a ferramenta *color deconvolution*, onde é possível gerar uma imagem em 8 bits (figura 18) e a partir dela, obter-se a intensidade dos *pixels* da área previamente marcada pelo DAB, com a geração de histograma (figura 19) e o valor da mensuração de intensidade.

RESULTADOS

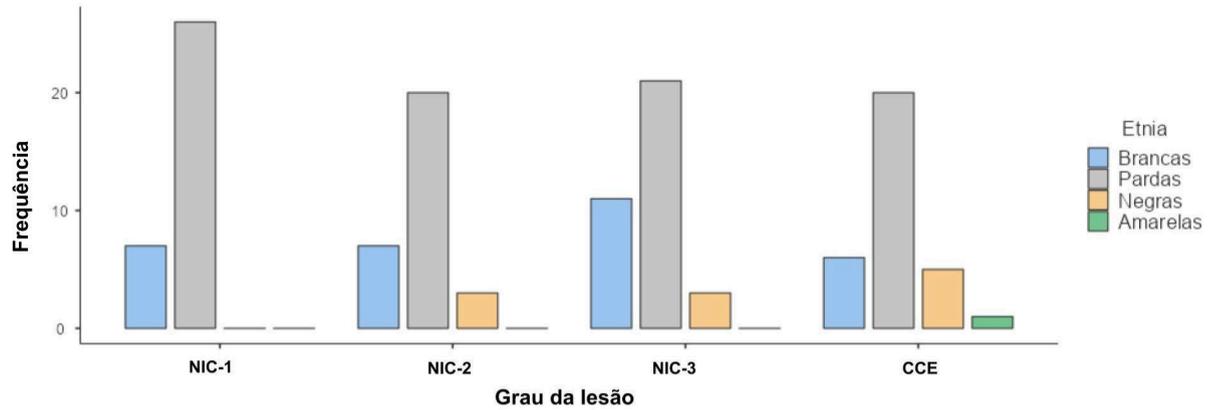
De início, foram analisados os prontuários para seleção dos casos de interesse e caracterização da população do estudo. No total foram selecionados 130 prontuários e coletadas as informações como diagnóstico, idade ao diagnóstico, idade da 1ª relação sexual e etnia. Na tabela 1, foram apresentados os dados das idades ao diagnóstico e da 1ª relação sexual, separadas por grau de lesão, com destaque para as idades mínimas ocorridas à época do diagnóstico para os casos de NIC-1, NIC-2 e NIC-3, sendo elas 19, 16 e 20 anos, respectivamente.

No gráfico 1, foram apresentadas as frequências a respeito da etnia autodeclarada pelas pacientes, separadas por grau da lesão, sendo a mais frequente a etnia parda, com 87 pacientes, representando 66,9% do total, seguida pela branca, com 31 pacientes e 23,8% do total.

Tabela 1 - Estatística descritiva referente as informações extraídas dos prontuários

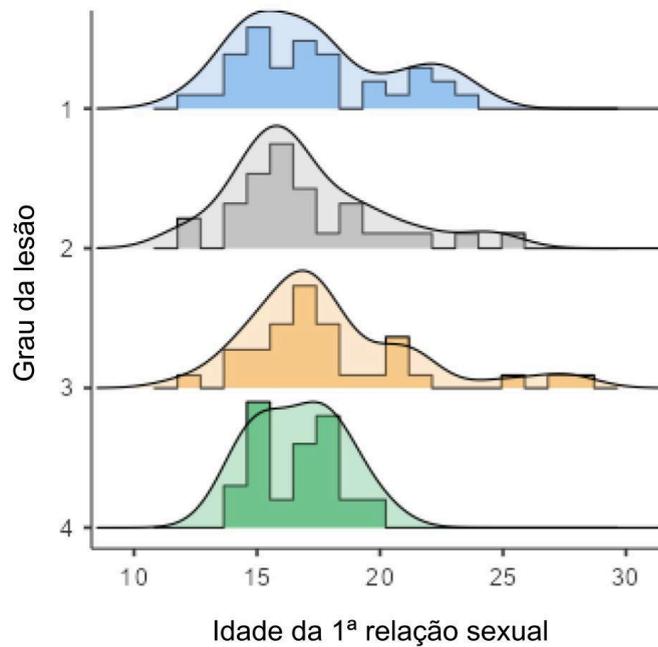
Variável	Grau da Lesão	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade da 1ª Relação Sexual	NIC-1	33	17.4	17	12	24
	NIC-2	30	16.9	16	12	25
	NIC-3	35	18	17	12	28
	CCE	32	16.7	17	14	20
Idade ao diagnóstico	NIC-1	33	38.4	38	19	56
	NIC-2	30	34.8	34.5	16	59
	NIC-3	35	37.7	36	20	63
	CCE	32	48	47	44	54

Fonte: o autor (2025)

Gráfico 1 - Frequência relativa à Etnia separadas por grau da lesão

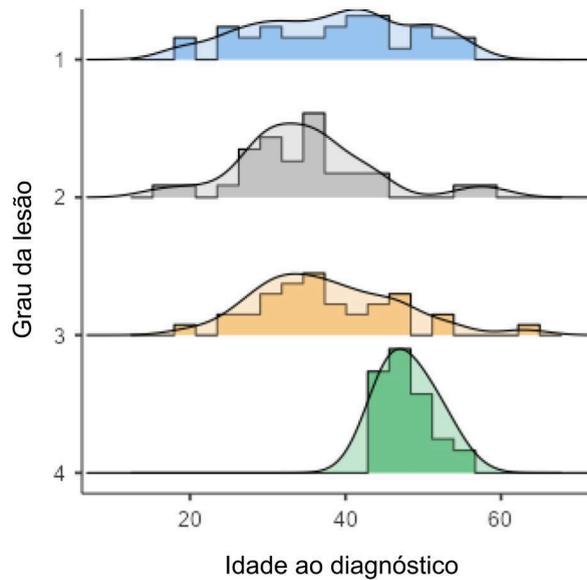
Fonte: o autor (2025)

Em seguida, nos gráficos 2 e 3, foram apresentadas as frequências absolutas referentes à idade da 1ª relação sexual e idade ao diagnóstico, individualizadas para cada grau de lesão e CCE.

Gráfico 2 - Frequências absolutas da idade da 1ª relação sexual separadas por grau da lesão

Fonte: o autor (2025)

Legenda: No eixo y, os números referem-se ao grau da lesão, NIC-1 (1), NIC-2 (2), NIC-3 (3) e CCE (4).

Gráfico 3 - Frequências absolutas da idade ao diagnóstico separadas por grau da lesão

Fonte: o autor (2025)

Legenda: No eixo y, os números referem-se ao grau da lesão, NIC-1 (1), NIC-2 (2), NIC-3 (3) e CCE (4).

Após a análise dos prontuários, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica em 126 cortes, no total, sendo 63 para cada biomarcador. Em 4 cortes, não foi possível realizar a imuno-histoquímica, pois as condições de fixação da amostra no momento do emblocamento, comprometeram sua qualidade e conseqüente recuperação antigênica. Na tabela 2, foram apresentados os dados referentes às intensidades de imunorreação para cada nível de lesão precursora e CCE. Em relação a MMP-14, observa-se um predomínio de imunorreações variando entre leve e intenso, já para a p16^{INK4a}, observa-se um perfil de intensificação gradual da imunorreação, com a maioria dos casos de CCE (19%) apresentando intensidade alta.

Tabela 2 - Distribuição relativa às intensidades de imunorreação

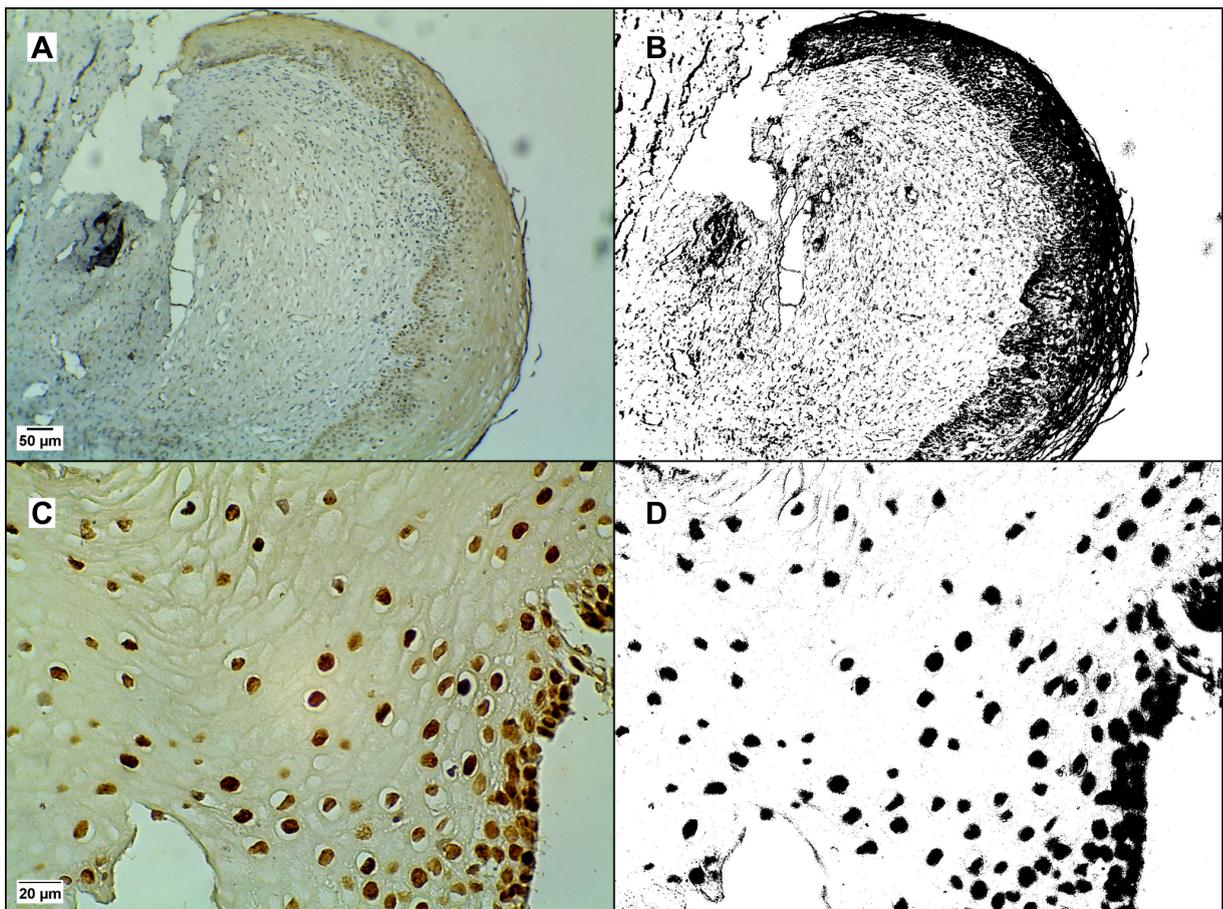
Grau da lesão	MMP-14 (n=63)	p16^{INK4a} (n=63)
NIC-1	Leve - 01 (1,6%)	Leve - 02 (3,2%)
	Moderada - 07 (11,1%)	Moderada - 12 (19%)
	Intensa - 08 (12,7%)	Intensa - 02 (3,2%)
NIC-2	Leve - 04 (6,3%)	Leve - 02 (3,2%)
	Moderada - 07 (11,1%)	Moderada - 07 (11,1%)
	Intensa - 04 (6,3%)	Intensa - 06 (9,5%)

	Leve - 00 (0%)	Leve - 00 (0%)
NIC-3	Moderada - 07 (11,1%)	Moderada - 04 (6,3%)
	Intensa - 09 (14,3%)	Intensa - 12 (19%)
	Leve - 03 (4,8%)	Leve - 00 (0%)
CCE	Moderada - 07 (11,1%)	Moderada - 04 (6,3%)
	Intensa - 06 (9,5%)	Intensa - 12 (19%)

Fonte: O autor (2025)

Nas figuras 20, 21, 22 e 23, foram apresentadas as imagens das imunorreações para cada biomarcador, bem como as imagens geradas em 8 bits a partir das imagens originais, utilizadas para mensuração da intensidade pelo *ImageJ*.

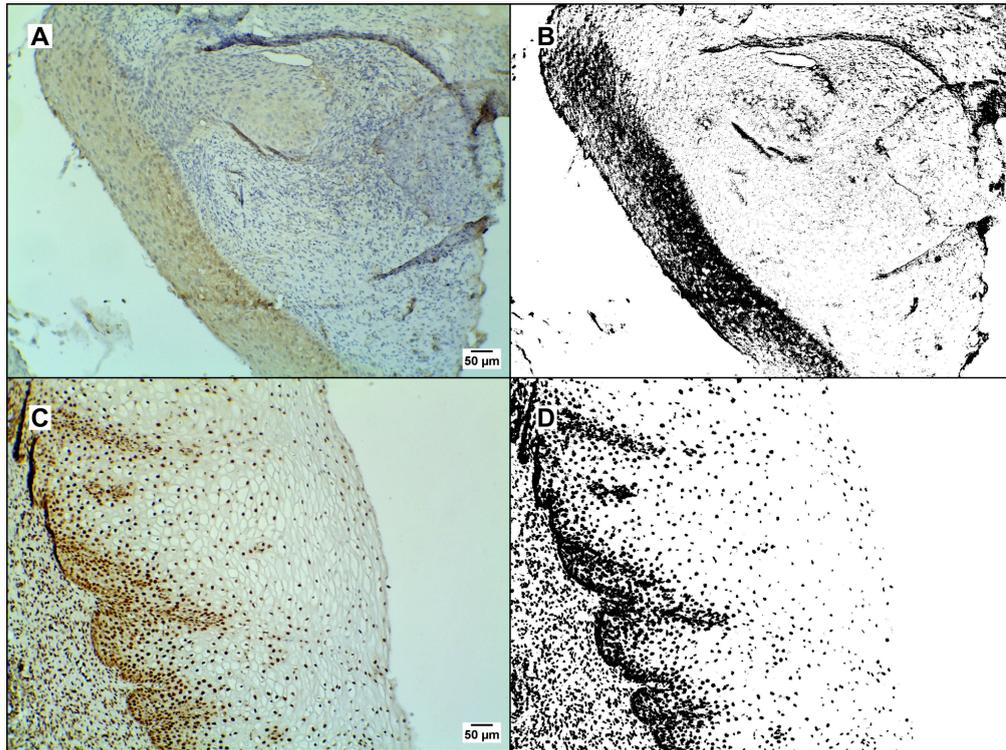
Figura 20 - Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16^{INK4a} em NIC-1



Fonte: o autor (2025)

Legenda: (A) imunorreação da MMP-14 em NIC-1, (B) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem A, (C) imunorreação da p16^{INK4a} em NIC-1 e (D) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem C. Aumento 100X.

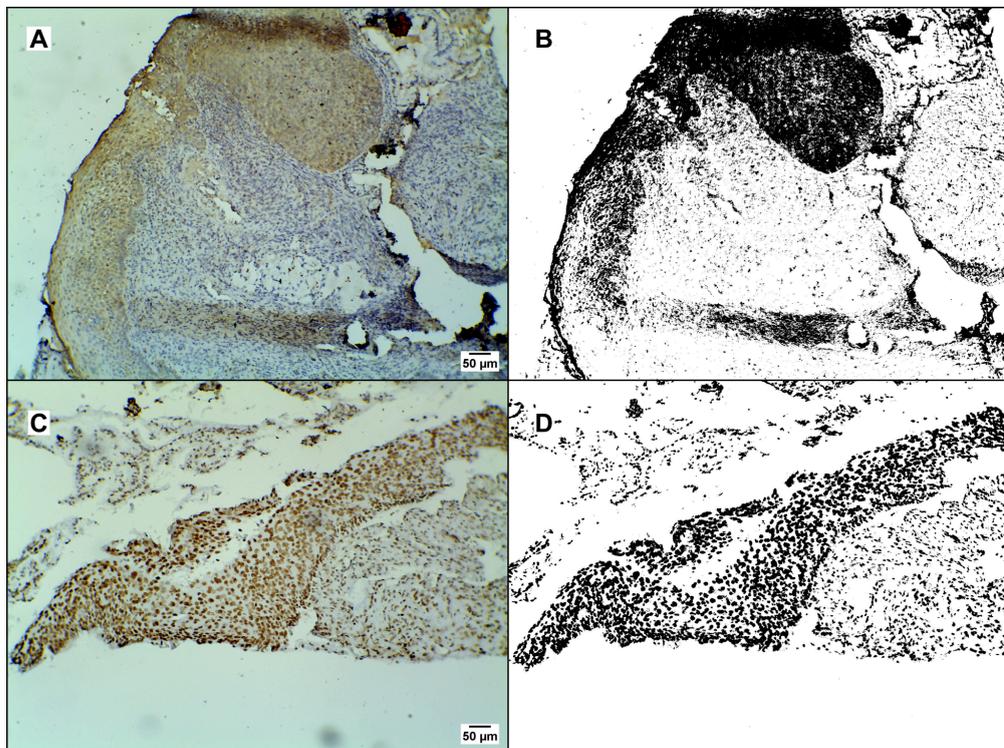
Figura 21 - Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16^{INK4a} em NIC-2



Fonte: o autor (2025)

Legenda: (A) imunorreação da MMP-14 em NIC-2, (B) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem A, (C) imunorreação da p16^{INK4a} em NIC-2 e (D) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem C. Aumento 100X.

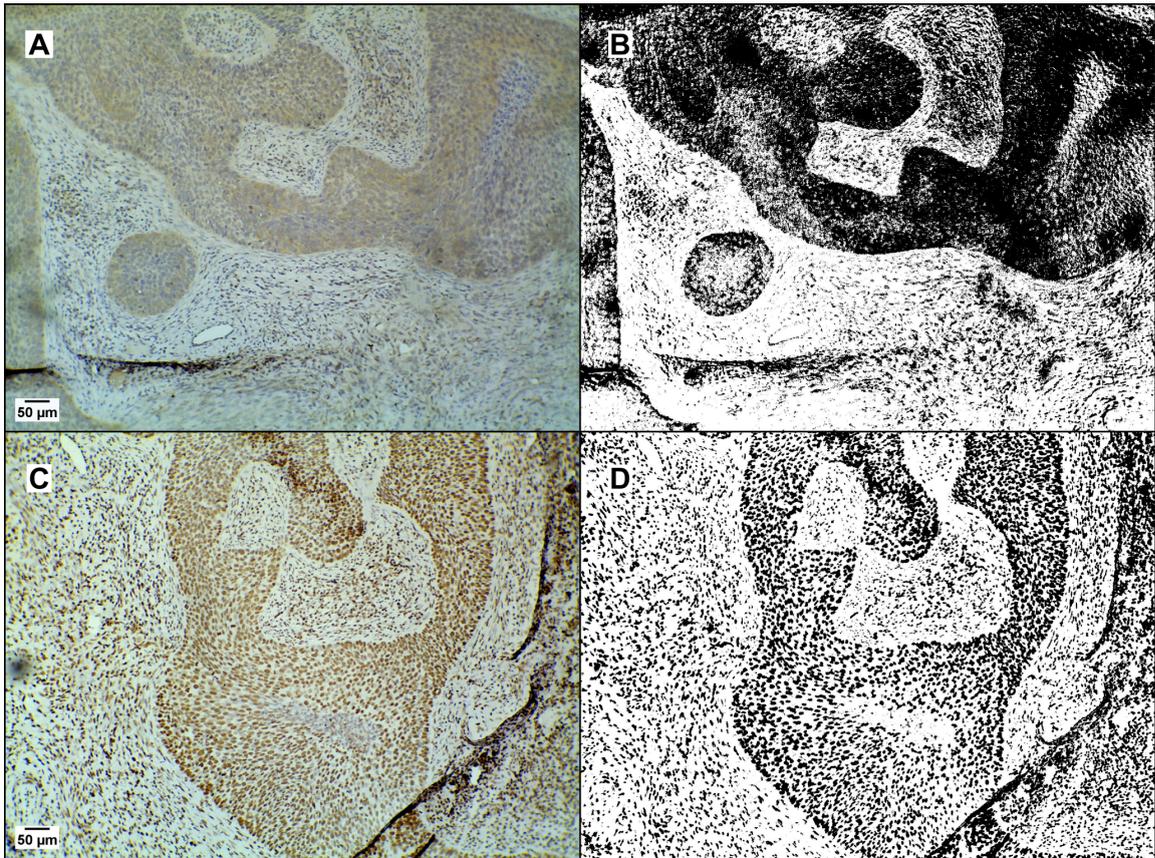
Figura 22 - Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16^{INK4a} em NIC-3



Fonte: o autor (2025)

Legenda: (A) imunorreação da MMP-14 em NIC-3, (B) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem A, (C) imunorreação da p16^{INK4a} em NIC-3 e (D) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem C. Aumento 100X.

Figura 23 - Padrão de imunorreatividade da MMP-14 e p16^{INK4a} em CCE

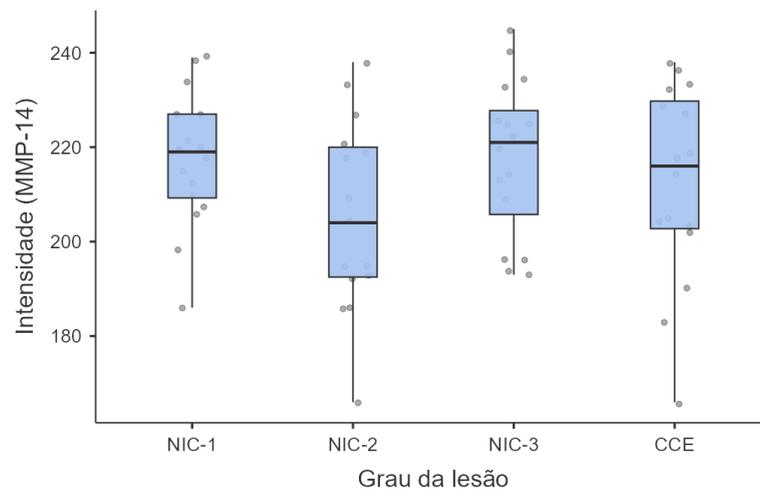


Fonte: o autor (2025)

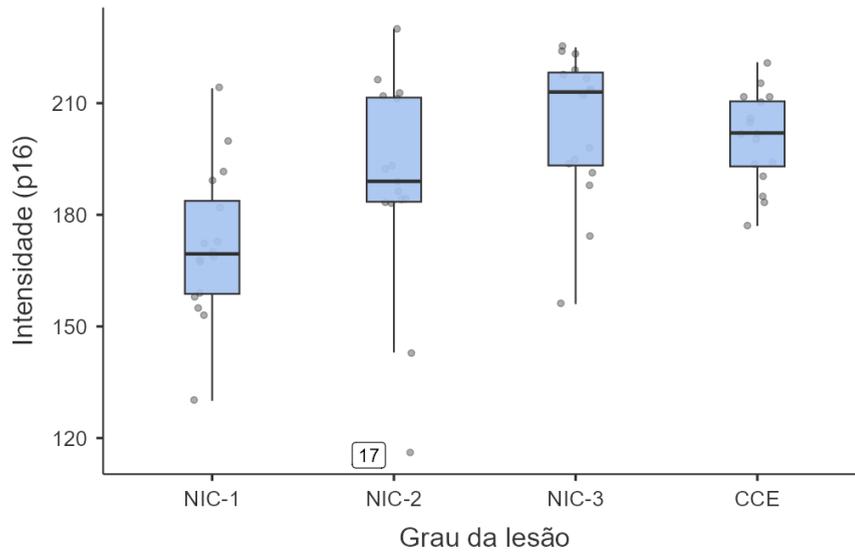
Legenda: (A) imunorreação da MMP-14 em CCE, (B) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem A, (C) imunorreação da p16^{INK4a} em CCE e (D) imagem gerada em 8 bits a partir da imagem C. Aumento 100X.

Nos gráficos 4 e 5, foram apresentadas as intensidades de imunorreação da MMP-14 e p16^{INK4a}, plotadas em representações gráficas e separadas por grau da lesão.

Gráfico 4 - Intensidade da imunorreação da MMP-14



Fonte: o autor (2025)

Gráfico 5 - Intensidade da imunorreação de p16^{INK4a}

Fonte: o autor (2025)

As intensidades de imunorreação, tanto para MMP-14, como para p16^{INK4a}, foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (tabela 3), confirmando a rejeição da hipótese nula para a intensidade de p16^{INK4a}, uma vez que houve significado estatístico com $p < 0,05$.

Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis para as intensidades de MMP-14 e p16^{INK4a}

Variáveis	X ²	gl	p
Intensidade MMP-14	3,99	3	0,263
Intensidade p16 ^{INK4a}	19,50	3	< 0,001

Fonte: o autor (2025)

A intensidade da imunorreação da MMP-14, quando realizado o teste de Dwass-Steel-Chritchlow-Fligner, utilizado para comparações múltiplas entre os graus de lesão precursora e CCE, não revelou valor estatisticamente significativo ($p > 0,05$), conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 - Comparação das intensidades de imunorreação da MMP-14 entre os graus de lesão

Comparações	W	p
NIC-1 / NIC-2	-2,43	0,312
NIC-1 / NIC-3	0,19	0,999
NIC-1 / CCE	-0,96	0,905
NIC-2 / NIC-3	2,60	0,255
NIC-2 / CCE	1,31	0,789
NIC-3 / CCE	-0,80	0,942

Fonte: o autor (2025)

Entretanto, para as comparações múltiplas entre os graus de lesão para a intensidade da imunorreação de p16^{INK4a}, houve relevância estatística ($p < 0,05$) em duas delas, NIC-1 / NIC-3 e NIC-1 / CCE, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5 - Comparação das intensidades de imunorreação da p16^{INK4a} entre os graus de lesão

Comparações	W	p
NIC-1 / NIC-2	3,24	0,099
NIC-1 / NIC-3	5,07	0.002
NIC-1 / CCE	5,31	0.001
NIC-2 / NIC-3	2,82	0.189
NIC-2 / CCE	1,62	0.660
NIC-3 / CCE	-1,60	0.670

Fonte: o autor (2025)

Em seguida, foram realizados os testes de Spearman e Pearson, utilizados para avaliar a força da correlação e a direção (direta ou inversamente proporcional) entre duas variáveis, sendo o primeiro para dados não paramétricos e o segundo, para dados paramétricos. Na tabela 6, foram apresentadas as correlações de Spearman e Pearson, entre as variáveis grau da lesão e intensidade de imunorreação da p16^{INK4a} e grau de lesão e intensidade de imunorreação da MMP-14. Nota-se que a correlação para a p16^{INK4a} e grau da lesão, foi significativa estatisticamente ($p < 0,05$) e diretamente proporcional, ou seja, com o desenvolver da lesão, a intensidade da imunorreação tende a elevar-se. Já a correlação para

MMP-14 e grau da lesão, não se revelou significativa, estatisticamente, porém apresentou uma direção inversamente proporcional, ou seja, com o agravamento da lesão, é provável que a intensidade da imunorreação diminua.

Tabela 6 - Matriz de correlação de Spearman e de Pearson entre as intensidades e grau da lesão

Variável	Grau da lesão	Gráfico da correlação
Intensidade p16 ^{INK4a}	Rho de Spearman	0,48
	gl	61
	p	< 0,001
Intensidade MMP-14	R de Pearson	-0,02
	gl	61
	p	0,887

Fonte: o autor (2025)

Legenda: Os valores de Rho de Spearman e R de Pearson, ocorrem entre -1 e +1, sendo os positivos, diretamente proporcionais e os negativos, inversamente proporcionais.

Após os testes de correlação, foram realizados os testes de regressão logística, utilizados para prever a probabilidade de um determinado resultado ocorrer entre mais de duas categorias. Na tabela 7, foram apresentados os dados referentes à regressão logística, utilizando as covariáveis intensidade de imunorreação para MMP-14 e para p16^{INK4a}, bem como os níveis de referência, com as seguintes relações: NIC-2 em relação a NIC-1, NIC-3 em relação a NIC-1 e CCE em relação a NIC-1.

Tabela 7 - Regressão logística para as intensidades de imunorreação da MMP-14 e p16^{INK4a}

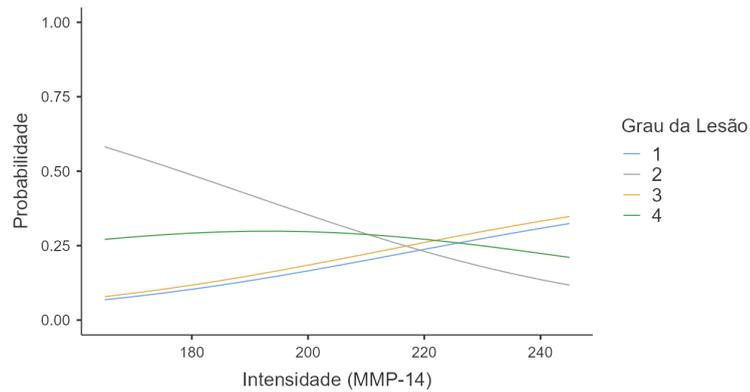
Relações	Preditor	Z	p
NIC-2/NIC-1	Intercepto	0,5743	0,566
	Intensidade MMP-14	-2,2872	0,022
	Intensidade p16 ^{INK4a}	2,0315	0,042
NIC-3/NIC-1	Intercepto	-4,3741	< 0,001

	Intensidade MMP-14	-0,0506	0,960
	Intensidade p16 ^{INK4a}	3,9535	< 0,001
	Intercepto	-1,9908	0,047
CCE/NIC-1	Intensidade MMP-14	-1,3463	0,178
	Intensidade p16 ^{INK4a}	3,3385	< 0,001

Fonte: o autor (2025)

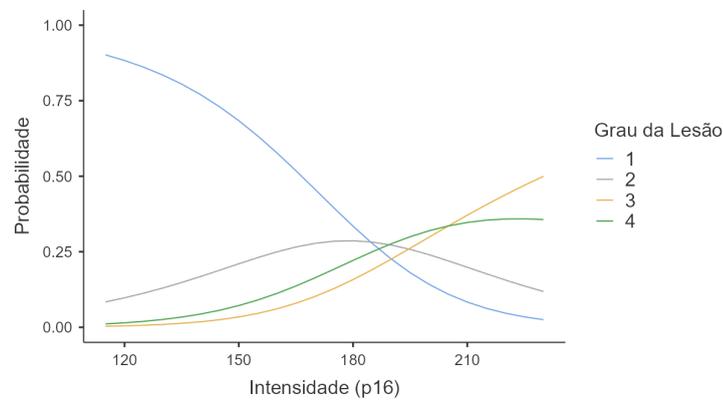
Nos gráficos 6 e 7, foram apresentadas curvas de probabilidade oriundas das relações apresentadas na tabela 7.

Gráfico 6 - Curvas das médias marginais estimadas para MMP-14



Fonte: o autor (2025)

Gráfico 7 - Curvas das médias marginais estimadas para p16^{INK4a}



Fonte: o autor (2025)

Nota-se, para a covariável intensidade de imunorreação da MMP-14, uma probabilidade maior de ocorrer lesões do tipo NIC-1 e NIC-3 em intensidades com valores mais expressivos.

Em contrapartida, para a $p16^{INK4a}$, nota-se que a probabilidade de ocorrências com o aumento da intensidade de imunorreação, eleva-se para os casos de NIC-3 e CCE.

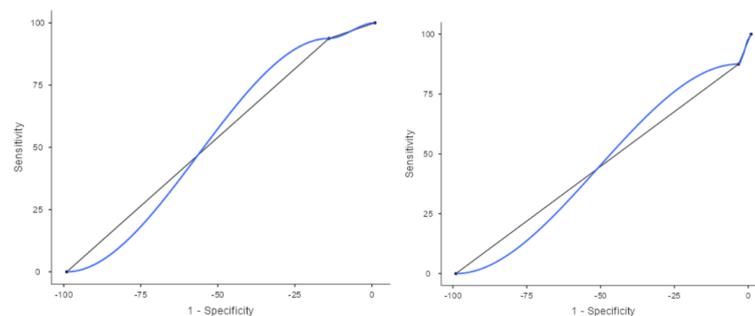
Por fim, foram plotadas as curvas de característica de operação relativa (ROC), visando avaliar o desempenho, individualmente, de cada biomarcador nos graus de lesão e CCE. Na tabela 8, foram apresentados os dados relativos a MMP-14 e $p16^{INK4a}$, bem como os valores das especificidades e sensibilidades, além da área sobre a curva (AUC) e, para os gráficos 8, 9, 10 e 11, foram apresentadas as curvas ROC para cada grau de lesão.

Tabela 8 - Dados obtidos para cálculo das curvas ROC

Biomarcador	Grau da lesão	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	AUC
MMP-14	NIC-1	93,75	14,89	0,543
	NIC-2	73,33	8,33	0,408
	NIC-3	100	17,02	0,585
	CCE	81,25	10,64	0,459
$p16^{INK4a}$	NIC-1	87,5	4,26	0,459
	NIC-2	86,67	4,17	0,454
	NIC-3	100	8,51	0,543
	CCE	100	8,51	0,543

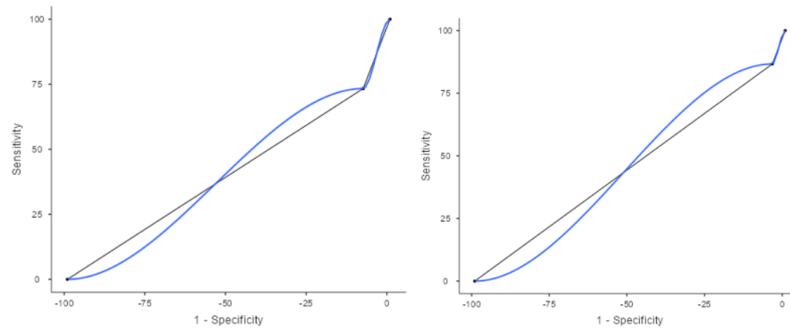
Fonte: o autor (2025)

Gráfico 8 - Curvas ROC para NIC-1



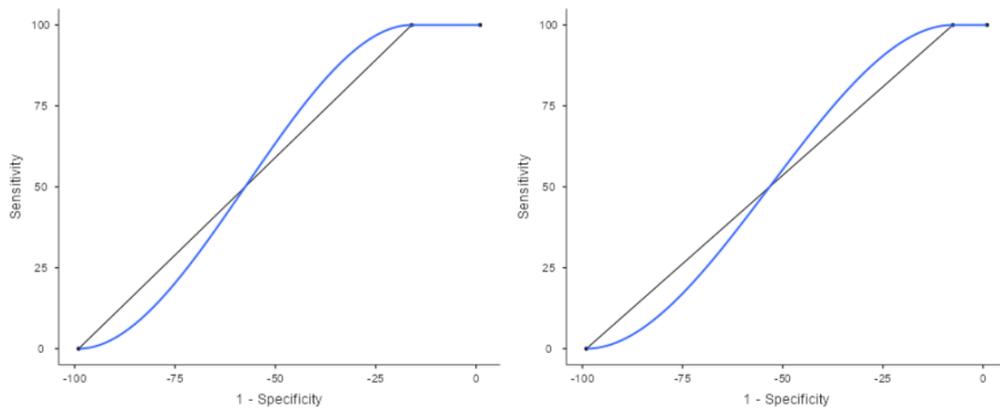
Fonte: o autor (2025)

Legenda: Na esquerda, curva ROC para MMP-14 e na direita, para $p16^{INK4a}$

Gráfico 9 - Curvas ROC para NIC-2

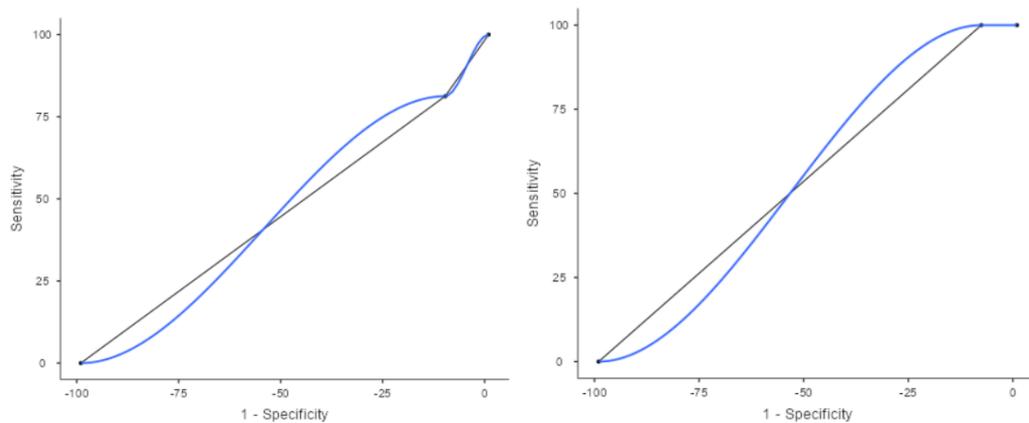
Fonte: o autor (2025)

Legenda: Na esquerda, curva ROC para MMP-14 e na direita, para p16^{INK4a}

Gráfico 10 - Curvas ROC para NIC-3

Fonte: o autor (2025)

Legenda: Na esquerda, curva ROC para MMP-14 e na direita, para p16^{INK4a}

Gráfico 11 - Curvas ROC para CCE.

Fonte: o autor (2025)

Legenda: Na esquerda, curva ROC para MMP-14 e na direita, para p16^{INK4a}

DISCUSSÃO

O desenvolvimento do câncer cervical está ligado à infecção persistente pelo HPV de alto risco, particularmente os tipos HPV-16 e HPV-18. Na progressão do câncer, várias vias moleculares e proteínas estão implicadas com a p16^{INK4a} e com a MMP-14, desempenhando papéis críticos em diferentes aspectos do desenvolvimento, invasão e progressão do tumor. Além disso, fatores como o início da atividade sexual de forma precoce, podem contribuir para a infecção persistente pelo HPV (Chen *et al.*, 2021; Herbster *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2022).

Conforme apresentado nos resultados, observou-se que o perfil das pacientes é constituído, na sua maioria, de mulheres pardas, diagnosticadas com algum tipo de lesão cervical, seja de baixo grau ou invasivas, com média de 39 anos na época do diagnóstico e início da atividade sexual por volta dos 17 anos. Na literatura, os dados referentes a idade das pacientes a época do diagnóstico possuem uma certa divergência, segundo Possati-Resende; Fritsch; Souza (2023) e Yasutake *et al.* (2024), em média as pacientes possuem 42,5 anos quando diagnosticadas, divergindo do observado no presente estudo, porém, variações são esperadas, uma vez que, a depender do objetivo da pesquisa, grau da lesão e critérios sócio-demográficos, espera-se que os perfis das pacientes sofram alterações.

Entretanto, observa-se uma redução na idade das pacientes diagnosticadas com algum tipo de lesão cervical, segundo Oliveira; Cruz; Correa (2022), a incidência do câncer cervical ocorria em maior frequência em pacientes acima dos 40 anos, porém, não é mais incomum observar casos na faixa-etária dos 20 aos 30 anos. Outro aspecto importante também é observado quando nos referimos aos óbitos, segundo Tallon *et al.* (2020), entre 2012 e 2016 foram confirmados 18574 óbitos no Brasil, sendo 189 ocorridos em pacientes menores de 25 anos e 8950 em maiores de 64 anos, ou seja, fora da faixa de rastreio.

Referente a expressão da p16^{INK4a}, ela está associada a inativação da via da pRb, que é um dos reguladores do ciclo celular, acumulando-se no citoplasma das células alteradas. Segundo Dovník; Repše Fokter (2023), esse acúmulo é diretamente proporcional ao tempo e intensidade da alteração provocada pelo HPV e pode ser identificada através da imuno-histoquímica. Höhn *et al.* (2021), sinalizam que a p16^{INK4a} tem potencial para ser utilizada como biomarcador substituto em lesões associadas ao HPV. Contudo, é importante adotar cautela ao utilizar a p16^{INK4a} de forma isolada, recomenda-se sua associação a outros biomarcadores, como a p53 ou a MMP-14, aumentando a precisão diagnóstica. A combinação de marcadores pode fornecer uma avaliação mais robusta e confiável. Essa abordagem

integrada contribui para uma interpretação mais precisa, reduzindo a possibilidade de falsos positivos ou negativos e auxiliando na tomada de decisão.

No presente estudo, nota-se uma elevação gradual da imunorreação da p16^{INK4a}, em amostras de NIC-1, 19% foram consideradas moderadamente intensas, já em NIC-3 e CCE, ambas apresentaram imunorreatividade consideradas intensas. Este perfil de imunorreação da p16^{INK4a} é corroborado por Wu *et al.* (2024) e Yasutake *et al.* (2024), onde afirmam que o percentual de positividade para a p16^{INK4a} varia de acordo com desenvolvimento da lesão, em estágios iniciais observa-se uma positividade relativamente moderada, evoluindo gradativamente com o agravamento da lesão. Na mesma linha de entendimento, Da Mata *et al.* (2021), identificaram 81% de intensidade de moderada a elevada em amostras de câncer cervical e 33% consideradas entre leve e moderada em amostras com lesão de baixo grau.

Outro aspecto importante, foi a significância estatística, com $p < 0,05$, para o teste de Kruskal-Wallis, rejeitando a hipótese nula, ou seja, os dados confirmam a relação entre intensidade e grau da lesão, além disso, observando-se a correlação de Spearman, percebe-se que essa relação é diretamente proporcional, reforçada pela regressão logística, onde aponta para uma maior probabilidade de ocorrência de NIC-3 e CCE, para perfis imunorreativos mais intensos.

Por fim, foi aplicado o teste ROC, para avaliar o perfil de sensibilidade e especificidade da p16^{INK4a} como biomarcador, apresentando uma sensibilidade média de 93% e uma especificidade média de 6,3%. Com este perfil, a p16^{INK4a} pode desempenhar um papel relevante na triagem primária, sendo eficaz na identificação de casos positivos. Embora não seja capaz de confirmar resultados negativos com alta precisão, essa confirmação pode ser realizada por meio de exames complementares. O principal benefício reside na capacidade de triar os casos positivos, minimizando o risco de que lesões precursoras ou cancerosas não sejam identificadas (Höhn *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2019).

Segundo Secosan *et al.* (2022), a p16^{INK4a} pode ser útil na triagem primária, identificando lesões de baixo grau, LSIL ou NIC-1, e esta possibilidade é potencializada quando existe a associação com outro biomarcador, por exemplo, Ki-67, visto que a p16^{INK4a} pode apresentar variação não apenas em casos de lesão ou neoplasia cervical, mas em casos de processos inflamatórios agudos ou crônicos, como observado na metaplasia escamosa.

Referente a análise imuno-histoquímica da MMP-14, sua regulação positiva está ligada à agressividade tumoral, promovendo não apenas a invasão de tecido adjacente, permitindo que as células tumorais rompam a membrana basal. Em nosso estudo, o perfil imunorreativo da MMP-14 apresentou um comportamento variável, com tendência

decrecente em lesões invasivas. No casos de NIC-1, a média de imunorreação foi de 33,8%, com perfil entre moderado e intenso, já para os casos de CCE, a média de imunorreação foi de 20%, com a intensidade moderada predominante.

Segundo Chen *et al.* (2021), os mecanismos desreguladores do ciclo celular do HPV, acabam por estimular a transcrição das MMPs, levando ao aumento gradual de expressão à medida que a lesão progride, dessa forma, espera-se que em lesões de baixo grau, sua expressão seja considerada entre leve e moderada. Contudo, diferentemente do que foi assinalado pelos autores, a MMP-14, em nosso estudo, apresentou uma intensidade entre moderada e intensa, com imunorreação estromal.

Segundo Lee; Kim, (2022), várias são as vias de sinalização celular envolvidas na ativação de MMPs, incluindo MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), NF- κ B (fator nuclear kappa- β) e AMPK (proteína quinase ativada por AMP), ocorrendo, inclusive, translocações de MMP-3 e MMP-12 para o núcleo, modulando a sinalização do NF- κ B. Dessa maneira, *feedbacks* positivos podem sustentar a ativação das MMPs e as suas expressões podem sofrer variações positivas ou negativas no decorrer da lesão cervical. Ainda, segundo Chen *et al.* (2021), essa variação na intensidade da MMP-14, pode estar relacionada a sua própria função, uma vez que, além da sua própria ativação, ela é capaz de ativar a MMP-2, MMP-8 e MMP-13, sustentando suas ativações até o momento pré-invasivo das lesões. Após este momento, a ativação continuada da MMP-2, ativa a MMP-9 e ambas permanecem superexpressas em momentos pós-invasão.

É possível ainda, que a interação de maneira desequilibrada entre a MMP-14 e os seus inibidores TIMP-2 e RECK, influenciem em seu perfil imunorreativo, variando com o desenvolvimento da lesão. Segundo Azevedo Martins *et al.* (2020), a diferença na imunorreação da MMP-14, quando comparada a sua expressão em NIC-1 e CCE, pode ser explicada pela sua função ativadora de outras MMPs, como a MMP-2, bem como pela inibição provocada pelo TIMP-2, que possui um papel dicotômico no microambiente tumoral, podendo inibir diretamente a ação da MMP-2 ou atuar em conjunto com a MMP-14 + Pro-MMP-2 e liberar, consequentemente, a forma ativa da MMP-2, influenciando nessa variação entre os graus de lesão.

Em seguida, foram avaliadas, estatisticamente, as relações entre os graus de lesão e a intensidade de imunorreação da MMP-14, aplicando-se o teste para comparações múltiplas Dwass-Steel-Christchlow-Fligner. Apesar das diferenças em valores absolutos terem sido percebidas, não houve significância estatística, com $p > 0,05$. Entretanto, é possível que o

quantitativo amostral possa ter influenciado nesse valor, sendo prudente, análises com valores amostrais mais robustos.

Na sequência, foi realizada a correlação de Pearson, também não apresentando um valor estatisticamente significativo, com $p > 0,05$. Porém, nesse tipo de teste é possível identificar a direção da relação, sendo ela direta ou inversamente proporcional. Para a MMP-14, a direção da relação foi inversamente proporcional (R de Pearson = $-0,02$), ou seja, seu comportamento imunorreativo tende a diminuir com o desenvolvimento da lesão cervical.

O comportamento inversamente proporcional, observado na correlação de Pearson, também pôde ser observado na regressão logística, principalmente no primeiro nível de referência, NIC-2 em relação a NIC-1, com significância estatística e apenas nesse nível, com $p < 0,05$. Nos gráficos plotados dessas relações entre intensidade e grau da lesão, percebe-se que nos valores mais expressivos de intensidade, as maiores probabilidades de ocorrência são para as lesões do tipo NIC-1 e NIC-3.

Por fim, a exemplo do que foi realizado para a $p16^{INK4a}$, também foi realizado o teste ROC para avaliar a sensibilidade e especificidade da MMP-14 como um biomarcador. Para sensibilidade, foi obtida uma média de 87,08% e para especificidade, ainda que melhor do que a $p16^{INK4a}$, foi de 12,72% em média. O uso de um biomarcador com alta sensibilidade e baixa especificidade pode ser justificado em determinados contextos clínicos e de pesquisa, dependendo dos objetivos e das aplicações pretendidas. Na triagem primária, a exemplo da $p16^{INK4a}$, seria capaz de identificar corretamente a maioria dos casos positivos (verdadeiros positivos), minimizando o risco de falsos negativos. Esse desempenho é particularmente relevante em programas de rastreio de doenças, cujo principal objetivo é detectar o maior número possível de casos. Ao garantir uma alta sensibilidade, a MMP-14 contribui para uma identificação precoce e eficaz, essencial para o sucesso de estratégias de prevenção e intervenção.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo analisar a correlação entre a expressão imuno-histoquímica da MMP-14 e da p16^{INK4a}, no desenvolvimento do câncer cervical, desde o seu momento inicial como lesão intraepitelial de baixo grau, até o carcinoma estabelecido.

Observa-se uma tendência de diminuição da faixa etária no momento do diagnóstico, possivelmente relacionada à redução da idade de início da atividade sexual. Embora a idade média da primeira relação sexual seja de 17 anos, algumas pacientes relataram ter tido sua primeira relação entre 12 e 14 anos. Esse cenário reforça a importância da vacinação contra o HPV, bem como a necessidade de revisão das recomendações atuais do programa de rastreamento, a fim de adequá-las à realidade epidemiológica e garantir uma detecção precoce mais eficaz.

Em relação aos testes imuno-histoquímicos, houve variação entre as intensidades imunorreativas mensuradas para cada grau de lesão e CCE. Sendo estatisticamente significativas para p16^{INK4a} e parcialmente para MMP-14.

Baseado no perfil de sensibilidade e especificidade, ambas podem ser utilizadas como biomarcadores de triagem primária. Contudo, é necessário que estudos futuros avaliem de maneira quantitativa o padrão de expressão da p16^{INK4a} e da MMP-14, identificando o padrão condizente com o processo inflamatório e diferenciando-o daquele encontrado em um padrão neoplásico.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, G. S. **Avaliação imunohistoquímica da oncoproteína E6, P16INK4a, MMP-3 e TIMP-2 nas lesões precursoras e câncer cervical de mulheres infectadas pelo HPV de alto risco oncogênico.** 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- ARAÚJO, R. V. D. S. *et al.* Metaloproteínas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 82, 2011.
- AZEVEDO MARTINS, J. M. *et al.* Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 660, 2020.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.
- CÂMARA, G. N. N. D. L. *et al.* Os papilomavírus humanos – HPV: carcinogênese e imunogênese. **Universitas: Ciências da Saúde**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 503, 2008.
- CARDEAL, L. B. D. S. *et al.* HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e33585, 2012.
- CHEN, W. *et al.* Prognostic Role of Matrix Metalloproteinases in Cervical Cancer: A Meta-Analysis. **Cancer Control**, [s. l.], v. 28, p. 107327482110337, 2021.
- CIBAS, E. S.; DUCATMAN, B. S. **Cytology: diagnostic principles and clinical correlates.** 5. Editioned. Philadelphia: Elsevier, 2020.
- DA MATA, S. *et al.* P16 and HPV Genotype Significance in HPV-Associated Cervical Cancer—A Large Cohort of Two Tertiary Referral Centers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 2294, 2021.
- DE ALMEIDA, L. G. N. *et al.* Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 714–770, 2022.
- DOVNIK, A.; REPŠE FOKTER, A. The Role of p16/Ki67 Dual Staining in Cervical Cancer Screening. **Current Issues in Molecular Biology**, [s. l.], v. 45, n. 10, p. 8476–8491, 2023.
- FRAPPART, L. *et al.* **Histopathology and cytopathology of the uterine cervix digital atlas.** Lyon, France: International Agency for Research on Cancer: Distributed by IARCPress, 2003.
- HERBSTER, S. *et al.* Low RECK Expression Is Part of the Cervical Carcinogenesis Mechanisms. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2217, 2021.
- HÖHN, A. K. *et al.* 2020 WHO Classification of Female Genital Tumors. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, [s. l.], v. 81, n. 10, p. 1145–1153, 2021.

- HOSSEINI, M. S. *et al.* Comparison of Ki67 index and P16 expression in different grades of cervical squamous intraepithelial lesions. **Caspian Journal of Internal Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.22088/cjim.14.1.69>. Acesso em: 24 jul. 2024.
- IBEANU, O. A. Molecular pathogenesis of cervical cancer. **Cancer Biology & Therapy**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 295–306, 2011.
- ISHIKAWA, M. *et al.* P16INK4A expression might be associated with a favorable prognosis for cervical adenocarcinoma via dysregulation of the RB pathway. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 18236, 2021.
- IVKOVIĆ, I. *et al.* Role of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Locally Invasive Papillary Thyroid Cancer. **Biomedicines**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 3178, 2022.
- JAMAL, A. *et al.* Human Papillomavirus, MicroRNA and their Role in Cervical Cancer Progression, Diagnosis and Treatment Response: A Comprehensive Review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 977–988, 2020.
- LEE, H. S.; KIM, W. J. The Role of Matrix Metalloproteinase in Inflammation with a Focus on Infectious Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 18, p. 10546, 2022.
- LIMA, D. N. de O. **Cadernos de referências 1: citopologia Ginecológica**. [S. l.]: Ministério da Saúde, 2012. (Cadernos de referência).
- LIU, X. *et al.* Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-9 predicts papillary thyroid carcinoma prognosis. **Oncology Letters**, [s. l.], 2018. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9850>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- MA, X.; YANG, M. The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer. **American Journal of Translational Research**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 10830–10836, 2021.
- MANDAL, R. *et al.* Correlation Between p16/Ki-67 Expression and the Grade of Cervical Intraepithelial Neoplasias. **International Journal of Gynecological Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 384–390, 2020.
- MEKONNEN, A. G.; MITTIKU, Y. M. Early-onset of sexual activity as a potential risk of cervical cancer in Africa: A review of literature. **PLOS Global Public Health**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. e0000941, 2023.
- MENDONÇA, F. *et al.* Human Papillomavirus Modulates Matrix Metalloproteinases During Carcinogenesis: Clinical Significance and Role of Viral Oncoproteins. **In Vivo**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 2531–2541, 2022.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: A Historical Perspective. **Acta Cytologica**, [s. l.], v. 61, n. 4–5, p. 359–372, 2017.
- NILAND, S.; RISCANEVO, A. X.; EBLE, J. A. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 146, 2021.
- NTANANIS-STATHOPOULOS, I. *et al.* Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection. **Current trends in the management and prevention of human papillomavirus (HPV) infection**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 1281–1285, 2020.

OLIVEIRA, E. F. D. *et al.* A importância do papanicolau no diagnóstico de HPV e Câncer no colo do útero: The importance of pap smear in the diagnosis of HPV and cervical Cancer. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 79008–79029, 2022.

OLIVEIRA, B. L. F. P. D.; CRUZ, M. M. D.; CORREA, R. M. D. S. Incidência do câncer do colo de útero em jovens e o perfil socioeconômico deste grupo nas Regiões do Brasil. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 15, p. e328111537491, 2022.

PERKINS, R. B. *et al.* Cervical Cancer Screening: A Review. **JAMA**, [s. l.], v. 330, n. 6, p. 547, 2023.

POSSATI-RESENDE, J. C.; FRITSCH, T. Z.; SOUZA, K. C. B. Risk Profile of High-grade Cervical Lesions and Cervical Cancer Considering the Combination of Cytology, HPV Genotype, and Age among Women Undergoing Colposcopy. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics**, [s. l.], v. 45, n. 11, p. e689–e698, 2023.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T. A. **Atlas of descriptive histology**. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 2009.

SECOSAN, C. *et al.* Role of Dual-Staining p16/Ki-67 in the Management of Patients under 30 Years with ASC-US/L-SIL. **Diagnostics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 403, 2022.

SELLORS, J. W.; SANKARANARAYANAN, R. **Colposcopia e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical: manual para principiante**. Lyon: Centro Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, 2004.

SHI, Q. *et al.* Ki-67 and P16 proteins in cervical cancer and precancerous lesions of young women and the diagnostic value for cervical cancer and precancerous lesions. **Oncology Letters**, [s. l.], 2019. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10430>. Acesso em: 14 mar. 2025.

SILVA, I. N. de C. J. A. G. da. **Diretrizes brasileiras para rastreamento do câncer do colo do útero**. [S. l.]: Inca, 2016.

SILVA NETO, J. da C. **Citologia clínica do trato genital feminino**. [S. l.]: Thieme Revinter, 2019.

SONG, F. B. *et al.* [Clinical value of p16INK4a immunocytochemistry in cervical cancer screening]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, [s. l.], v. 55, n. 11, p. 784–790, 2020.

TALLON, B. *et al.* Tendências da mortalidade por câncer de colo no Brasil em 5 anos (2012-2016). **Saúde em Debate**, [s. l.], v. 44, n. 125, p. 362–371, 2020.

VIEIRA, G. V. *et al.* Proteases and HPV-Induced Carcinogenesis. **Cancers**, [s. l.], v. 14, n. 13, p. 3038, 2022.

VOLKOVA, L. V.; PASHOV, A. I.; OMELCHUK, N. N. Cervical Carcinoma: Oncobiology and Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 22, p. 12571, 2021.

WILBUR, D. C. **Sistema Bethesda para relato de citologia cervical: definições, critérios e notas explicativas**. [S. l.]: Não definido, 2018.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

WU, J. *et al.* Immunohistochemical markers Ki67 and P16 help predict prognosis in locally advanced cervical cancer. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, [s. l.], p. S0301211524000381, 2024.

YASUTAKE, N. *et al.* Immunohistochemical p16 overexpression and Rb loss correlate with high-risk human papillomavirus infection in endocervical adenocarcinomas. **Histopathology**, [s. l.], v. 84, n. 7, p. 1178–1191, 2024.

ZHANG, Y. *et al.* Associations of multi-human papillomavirus infections with expression of p16 in a cohort of women who underwent colposcopy: a retrospective study of 5165 patients. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 13, p. 1265726, 2023.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO DURANTE O MESTRADO**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECK E TIMP-2 E DAS METALOPROTEINASES 2 E 9
EM LESÕES CERVICAIS**

DOI: 10.53660/CLM-4114-24S12

**Expression of RECK and TIMP-2 Proteins and Matrix
Metalloproteinases 2 and 9 in Cervical Lesions****Expressão das proteínas RECK e TIMP-2 e das Metaloproteínas de matriz 2 e 9
em lesões cervicais**

Received: 01-08-2024 | Accepted: 01-09-2024 | Published: 04-09-2024

Emmanuel Nóbrega Travassos de ArrudaORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9904-4913>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: emmanuel.nobrega@ufpe.br**Gabriel José Mattos Leão**ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-5225-5661>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: gabriel.mattosleao@ufpe.br**Helbert Gean da Silva**ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2373-5162>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: helbert.gean@ufpe.br**Isa Cordeiro da Silva**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1334-2574>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: isa.cordeiros@ufpe.br**Julliano Matheus de Lima Maux**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5346-3525>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: julliano.maux@ufpe.br**Carlos Daniel Passos Lobo**ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-9673-8805>
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil
E-mail: carlos.passos@uncisal.edu.br**Jacinto da Costa Silva Neto**ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4418-801X>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: jacinto.costa@ufpe.br

ABSTRACT

Cervical cancer remains a significant global public health challenge, with alarming incidence rates in developing countries due to poor socioeconomic conditions, limited access to healthcare services, low vaccination coverage, and insufficient education. This study aimed to evaluate the expression of RECK and TIMP-2 proteins, as well as matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 in cervical lesions, using immunohistochemistry techniques on cervical biopsy samples. A total of 146 histopathological samples were analyzed, classified into different grades of cervical lesions: CIN-I, CIN-II, and CIN-III. Statistical analysis, conducted using Jamovi software, included Shapiro-Wilk tests, Spearman correlation, and logistic regression to assess the probability of immunostaining in the development of cervical lesions. The expression of MMPs-2 and -9 was positively correlated with the progression of cervical lesions, while the inhibitors TIMP-2 and RECK showed downregulation, suggesting a crucial role in the inhibition of cervical carcinogenesis.

Keywords: Uterine cervical neoplasms; Matrix metalloproteinases; Biomarkers; Immunohistochemistry; Public Health

RESUMO

O câncer cervical permanece um desafio significativo de saúde pública global, com uma incidência alarmante em países em desenvolvimento devido a condições socioeconômicas precárias, acesso limitado aos serviços de saúde, baixa cobertura vacinal e educação insuficiente. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão das proteínas RECK e TIMP-2, bem como das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 em lesões cervicais, utilizando técnicas de imuno-histoquímica em amostras de biópsias cérvico-uterinas. Foram analisadas 146 amostras histopatológicas, classificadas em diferentes graus de lesão cervical: NIC-I, NIC-II e NIC-III. A análise estatística, realizada com o software Jamovi, incluiu testes de Shapiro-Wilk, correlação de Spearman e regressão logística para avaliar a probabilidade de imunomarcção no desenvolvimento das lesões cervicais. A expressão das MMPs-2 e -9 foi positivamente correlacionada com a progressão das lesões cervicais, enquanto os inibidores TIMP-2 e RECK apresentaram uma regulação negativa, sugerindo um papel crucial na inibição da carcinogênese cervical.

Palavras-chave: Câncer do colo do útero; Metaloproteinase de matriz; Biomarcadores; Imuno-histoquímica; Saúde Pública

INTRODUÇÃO

O câncer cervical ainda é um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Em 2022, foram registrados 661.021 casos, com 348.189 óbitos, ocupando a oitava posição em número de casos e a nona em número de mortes. Nos países em desenvolvimento os números são mais expressivos, pois precárias condições socioeconômicas, dificuldades no acesso à saúde, baixa cobertura vacinal e uma educação deficiente, têm contribuído para um panorama desfavorável, com uma taxa de mortalidade de 19,3 por 100.000 habitantes, frente a 12,1 em países desenvolvidos (GLOBOCAN, 2024). A idade da primeira relação sexual também tem sido associada ao desenvolvimento do câncer cervical, com risco maior atrelado a uma iniciação sexual precoce (Mekonnen; Mittiku, 2023).

A infecção e persistência do Papilomavírus Humano (HPV) é o fator determinante para o desenvolvimento do câncer cervical, relacionado a mais de 99% dos casos. As oncoproteínas E5, E6 e E7, expressas pelos HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 82), são os principais agentes da carcinogênese e do desenvolvimento do câncer cervical. Elas atuam em muitas vias fisiológicas celulares e em proteínas que controlam funções vitais para a células, como as do ciclo celular, da resposta imune, expressão gênica, diferenciação, reparo de DNA e apoptose (Doorbar, 2006; Ibeanu, 2011; Zur Hausen, 2002).

A oncoproteína E6 possui um papel bem estabelecido na oncogênese cervical. Observou-se que seus níveis sofrem alteração à medida que a progressão displásica avança, com isso, evidenciando seu possível papel como biomarcador para avaliação prognóstica. Esta oncoproteína é capaz de induzir a degradação da p53 e regular positivamente o VEGF, Bcl-2 e NF- κ B, dando suporte, assim, à sobrevivência, proliferação, angiogênese e invasão celular (De Almeida *et al.*, 2022). Enquanto isso, a oncoproteína E7 atua fosforilando a proteína do retinoblastoma (pRb) e liberando o fator de transcrição E2F, com progressão anormal do ciclo celular. Esse processo gera um feedback negativo, com consequente expressão da proteína p16, importante marcador da integração e capacidade tumorigênica promovida pelo HPV (Song *et al.*, 2020).

Entre os alvos de E6 e E7 têm-se as metaloproteinases de matriz (MMPs), o inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) e a proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal (RECK), com a oncoproteína viral regulando positivamente a expressão das MMPs e negativamente TIMPs e RECK, apoiando consideravelmente a carcinogênese cervical (De Almeida *et al.*, 2022; Herbster *et al.*, 2021).

As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco que regulam o microambiente tumoral e outras atividades celulares, como degradação da matriz extracelular (MEC), adesão celular, proliferação, maturação, apoptose, migração, invasão, angiogênese tumoral, transições mesenquimais epiteliais (EMT) e vigilância imunológica. Devido a isso, são reguladas positivamente em uma ampla gama de tumores, inclusive cervicais, contribuindo para a progressão das lesões e um mal prognóstico (Chen *et al.*, 2021; Herbster *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2022).

Em contrapartida, os inibidores TIMP e RECK, por sua vez, apresentam efeitos ditos como antineoplásicos, isto é, bloqueiam o sítio catalítico das MMPs e dificultam seu contato com seus respectivos substratos. Observou-se que o TIMP-2, objeto deste estudo, é regulado negativamente por E7 em lesões invasivas, quando comparado a estágios displásicos anteriores. Já a RECK é regulada negativamente pela atividade das oncoproteínas E6 e E7. Esta proteína, ligada à membrana, inibe a atividade das MMPs através dos seus efeitos na transcrição, síntese e ativação destas enzimas, suprimindo a remodelação da matriz extracelular e dificultando a indução de processos invasivos e metástases (Amabebe; Ogidi; Anumba, 2022; Herbster *et al.*, 2021)

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e RECK, através de imuno-histoquímica, em lesões precursoras, a fim de considerá-las como potenciais biomarcadores para lesão cervical. Além disso, visa contribuir para a compreensão da biologia da tumorigênese cervical, bem como, para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas, diagnósticas e prognósticas mais eficientes.

MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco com número CAAE 17068913.6.0000.5208, atendendo integralmente aos princípios éticos estabelecidos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Foram utilizadas amostras de biópsia cérvico-uterina emblocadas em parafina e arquivadas no serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Inicialmente, os prontuários foram analisados para seleção dos casos de interesse e obtenção dos dados clínico-patológicos. Os casos incluídos foram aqueles diagnosticados histopatologicamente como neoplasia intraepitelial cervical (NIC).

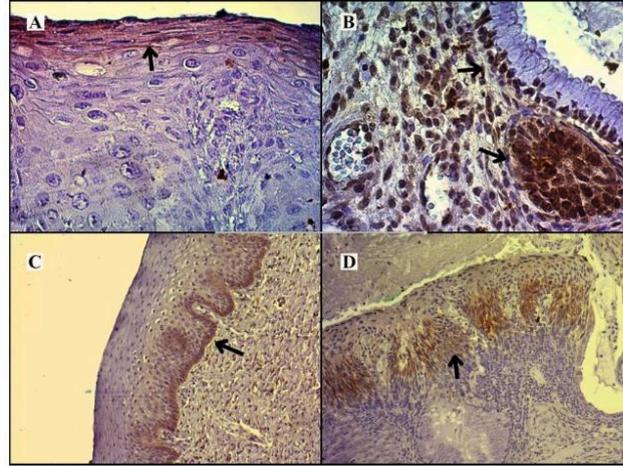
A imuno-histoquímica para as proteínas MMP-2, MMP-9, TIMP-2 e RECK foi realizada em cortes de 4 µm de espessura a partir de blocos parafinados contendo

fragmentos de biópsias encaminhadas para análise histopatológica. O método utilizado foi o livre de biotina e conjugado com HRP. Foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo contra as proteínas MMP-2 e MMP-9 (*Santa Cruz Biotechnology* e diluição 1:400), TIMP-2 e RECK (*Santa Cruz Biotechnology* e diluição 1:300).

A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão histológica por dois minutos. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e as etapas de bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio das reações inespecíficas e revelação por solução cromogênica com 3,3-diaminobenzidina (DAB) foram realizadas utilizando-se o kit de revelação da *Vector Laboratories (Newark, USA)*. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente, contra-coradas com hematoxilina, desidratadas e montadas com Entellan® e lamínula.

A análise da imunorreatividade (tabela 1) foi realizada semi-quantitativamente, por área e intensidade de marcação, classificadas em: sem marcação (0), intensidade fraca (1), moderada (2) e intensa (3). Todas as lâminas foram analisadas por dois citopatologistas, de maneira independente e sem acesso prévio a qualquer tipo de resultado. Para aqueles casos onde houve discrepância no resultado da análise, uma terceira avaliação foi realizada adotando-se os mesmos critérios. Foi utilizado microscópio óptico ZEISS® com câmera acoplada (*AxioCam MRC*), para registro de imagens pelo sistema de captura *ZEN blue edition* (Figura 1). O ponto de corte (*cut-off*) para se considerar amostras positivas para marcação foi a média estimada dos casos negativos para lesões, sem NIC.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software *Jamovi*, versão 2.3.28. Inicialmente, realizou-se a análise descritiva dos dados, com o cálculo das médias e desvios-padrões, bem como o teste de Shapiro-Wilk, para verificar a tendência de normalidade da distribuição amostral. Posteriormente, seguiu-se com o teste de Spearman, para avaliar a correlação entre as variáveis da pesquisa, e a regressão logística, para avaliar a probabilidade de marcação no desenvolvimento das lesões cervicais. Para significância estatística dos testes executados, foi atribuído o valor de $P < 0,05$.

Figura 1 – Imunorreatividade em diferentes graus de lesão

Nota: (A) MMP-9/NIC-1, (B) MMP-2/NIC-1, (C) TIMP-2/NIC-3 e (D) RECK/NIC-3.

RESULTADOS

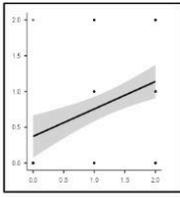
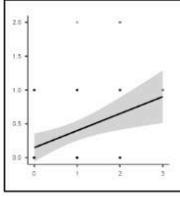
Inicialmente, foram analisados 240 prontuários, sendo selecionados aqueles que possuíam informações referentes ao laudo citopatológico, idade da primeira relação sexual (em média, 16 anos) e diagnóstico histopatológico. A idade média das pacientes à época do diagnóstico da lesão foi de 34,91 anos. No total, foram utilizadas 146 amostras, divididas histologicamente por grau de lesão cervical em: NIC-I (14), NIC-II (45) e NIC-III (87).

Tabela 1 - Níveis de intensidade de expressão imuno-histoquímica das MMPs (2 e 9), TIMP-2 e RECK para cada grau da lesão cervical.

Anticorpo	Grau da lesão	Intensidade da expressão IHQ			
		Sem Marcação	Fraca	Moderada	Intensa
MMP-2	NIC-1 (n=06)	5	0	0	1
	NIC-2 (n=19)	13	5	1	0
	NIC-3 (n=32)	5	15	11	1
MMP-9	NIC-1 (n=06)	4	2	0	0
	NIC-2 (n=19)	18	1	0	0
	NIC-3 (n=32)	17	12	3	0
TIMP-2	NIC-1 (n=07)	4	2	1	0
	NIC-2 (n=26)	14	6	6	0
	NIC-3 (n=55)	22	15	18	0
RECK	NIC-1 (n=07)	5	0	2	0
	NIC-2 (n=26)	10	10	6	0
	NIC-3 (n=55)	8	15	32	0

Uma vez identificada a tendência de não normalidade da distribuição amostral, foi executado o teste de correlação de Spearman (tabela 2), utilizado para avaliar a intensidade da relação entre as variáveis ordinais. Os valores para o teste em questão, variam entre -1 e +1, quanto mais próximo dos extremos, mais forte é a correlação, sendo os valores positivos diretamente proporcionais e os negativos inversamente proporcionais.

Tabela 2. Correlação de Spearman entre o grau da lesão cervical e as idades das pacientes, 1ª relação sexual, expressão de MMPs (2 e 9), TIMP-2 e RECK.

Variáveis	Grau da lesão		Gráficos do pareamento
	p	Rho	
1ª relação sexual	0,003	0,188	
Idade	0,062	0,121	
MMP-2	< 0,001	0,524	
MMP-9	0,012	0,330	
TIMP-2	0,152	0,154	
RECK	< 0,001	0,383	
Pareamentos			
MMP-2 e MMP-9	0,008	0,349	
RECK e TIMP-2	< 0,001	0,370	

Nota: o Rho refere-se ao coeficiente de correlação de Spearman e os gráficos A e B referem-se à correlação pareada entre MMP-2 e MMP-9 e TIMP-2 e RECK, respectivamente.

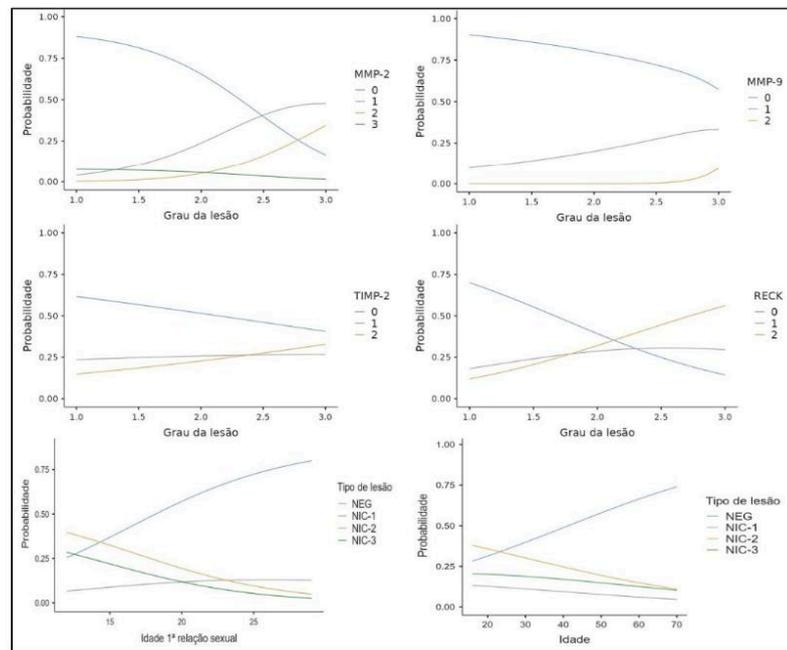
Dessa forma, analisou-se a correlação entre o grau da lesão cervical e as idades das pacientes à época da primeira relação sexual e à época do diagnóstico da lesão, tendo-se observado significância estatística para a primeira associação. Também avaliou-se a correlação entre a intensidade de marcação dos biomarcadores e o grau da lesão cervical, apresentando como destaque as metaloproteinases de matriz-2 e -9, bem como o inibidor RECK. Em seguida, foi realizada a comparação entre os biomarcadores, quando associados, apresentando valores significativos.

Por fim, executou-se a Regressão Logística (tabela 3) para estimar a probabilidade do grau da lesão cervical influenciar no nível de intensidade de expressão dos biomarcadores. Calculou-se, também, a razão de chances (RC), analisando-se, para os diferentes graus de lesão, as chances dos níveis de expressão serem mais intensos (1 a 3), quando comparadas às de não apresentarem imunorreatividade (0). Observou-se significância em MMP-2 e RECK, ambas para as comparações pareadas: marcação fraca-

ausente (1-0) e marcação moderada-ausente (2-0). Já a RC para MMP-2 esteve mais elevada, se relativa aos valores obtidos de RECK para as mesmas comparações pareadas anteriores.

Tabela 3. Regressão Logística entre os graus da lesão cervical e os níveis de intensidade de marcação IHQ para as MMPs (2 e 9), TIMP-2 e RECK, Idade e 1ª relação sexual

Biomarcador	Frac/Ausente		Moderada/Ausente		Intensa/Ausente	
	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)
MMP-2	0,001	7,938	0,004	26,706	1,00	1,00
MMP-9	0,115	2,318	0,723	916,858	-	-
TIMP-2	0,502	1,310	0,167	1,829	-	-
RECK	0,025	2,819	< 0,001	4,785	-	-
Variável clínica	NIC-1/NEG		NIC-2/NEG		NIC-3/NEG	
	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)
1ª Relação sexual	0,678	0,97	0,002	0,83	0,003	0,81
Idade	0,110	0,96	0,013	0,96	0,096	0,97



Nota: Médias Marginais para Regressão Logística. As numerações 1.0, 2.0 e 3.0 na linha Grau da Lesão correspondem às NIC-1, 2 e 3, respectivamente.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, houve correlação significativa entre a idade das pacientes à época da primeira relação sexual (< 18, em média) e o grau da lesão cervical à época do diagnóstico, corroborando os resultados de Mekonnen e Mittiku (2023), que revelaram maior risco de desenvolvimento de câncer cervical em pacientes com atividade sexual precoce. Possíveis razões incluem o incompleto estado de desenvolvimento do sistema reprodutor feminino à adolescência e o desconhecimento dos métodos de prevenção à infecção pelo HPV, conforme proposto por Zhou *et al.* (2024).

As análises IHQ evidenciaram resultados promissores para as MMPs-2 e -9 e o inibidor RECK, destacando-se o potencial desses biomarcadores de prever a progressão da lesão cervical, desde NIC-1 até NIC-3, principalmente quando são analisadas as correlações entre MMP-2 e -9 e RECK e TIMP-2. A imunorreatividade para MMP-2 esteve fortemente associada ao grau da lesão cervical, com maiores chances de a marcação ser mais intensa à medida que a lesão progride. Conforme proposto por Martins *et al.* (2020) é possível que a expressão aumentada de MMP-2 esteja associada à desregulação de TIMP-2 no microambiente tumoral, a qual em complexo com MMP-14 e pró-MMP-2 constitui a forma ativa da MMP-2.

A expressão de MMP-9 apresentou significativa associação ao grau da lesão cervical. Isso está consoante ao apresentado por Discacciati *et al.* (2015), que identificou maior marcação de MMP-9 em NIC-2, NIC-3 e carcinoma escamoso, quando comparada a casos de NIC-1 e benignos. É provável que MMP-9 esteja fortemente expressa nessas lesões em razão de sua atividade proteolítica sobre o colágeno tipo IV, que está associada à progressão tumoral, conforme proposto por Chen *et al.* (2021).

Quando analisadas de forma pareada, MMP-9 e MMP-2 apresentaram expressões diretamente proporcionais, sugerindo que os níveis de ambas tendem a se elevar sincronicamente à medida que o grau da lesão se intensifica. Resultados semelhantes foram encontrados por Matheus *et al.* (2014), que identificaram aumento na expressão imuno-citoquímica de MMP-9 condicionado à progressão da lesão.

A imunorreatividade para o inibidor RECK esteve significativamente associada ao grau da lesão cervical, com as análises de regressão identificando chances consideráveis de a expressão ser mais intensa conforme a lesão cervical evolui. É provável, porém, que haja sub-expressão de RECK em carcinomas invasivos, já que mecanismos regulatórios das oncoproteínas virais atuam reduzindo a ativação de

RECK, levando a um desbalanço na inibição de certas MMPs e a uma maior agressividade da lesão, conforme proposto no estudo de Cardeal *et al.* (2012).

O padrão de expressão de TIMP-2 foi semelhante ao de RECK, com a análise pareada evidenciando correlação significativa entre ambos. É possível que TIMP-2 e RECK atuem conjuntamente para inibir a ativação das MMPs, mas os mecanismos envolvidos nessa cooperação precisam ser melhor esclarecidos.

Este estudo apresentou algumas limitações em seu desenvolvimento. No tocante à baixa quantidade de lesões do tipo NIC-1, considerou-se como parâmetro as diretrizes para o rastreio do câncer de colo do útero no Brasil. Dessa forma, é recomendado para lesões de baixo grau (LSIL), equiparadas à NIC-1, em pacientes com menos de 25 anos, repetir a citologia após 3 anos; tendo mais de 25 anos, após 6 meses e, permanecendo o grau da lesão ou confirmada a sua progressão, encaminha-se para colposcopia e biópsia (Silva, 2016).

Dessa maneira, é esperado um número menor de biópsias para os casos de NIC-I, visto que o período compreendido entre repetições e a biópsia propriamente dita, pode variar entre 6 meses e 3 anos. Em razão da baixa quantidade de amostras de carcinoma escamoso existentes, no período definido para coleta dos blocos histológicos, este estudo não analisou as possíveis associações entre lesões invasivas e a intensidade de expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores avaliados.

CONCLUSÃO

Este estudo investigou a expressão das proteínas RECK e TIMP-2, bem como das metaloproteinases de matriz (MMPs) 2 e 9 em lesões cervicais, revelando uma percepção significativa sobre a progressão do câncer cervical. A análise imuno-histoquímica demonstrou que a intensidade de expressão das MMPs-2 e -9, juntamente com seus inibidores TIMP-2 e RECK, variam conforme o grau da lesão cervical, sugerindo um papel crucial desses biomarcadores na carcinogênese cervical.

Os resultados indicaram uma correlação significativa entre a idade da primeira relação sexual e o grau da lesão cervical, corroborando estudos prévios que associam a atividade sexual precoce a um maior risco de desenvolvimento de câncer cervical. Este achado sublinha a necessidade de estratégias de prevenção e educação sexual voltadas para adolescentes, visando reduzir a incidência de infecções pelo Papilomavírus Humano (HPV) e, conseqüentemente, o risco de neoplasias cervicais.

A utilização de técnicas avançadas de imuno-histoquímica permitiu uma avaliação detalhada da expressão dos biomarcadores, destacando o potencial das MMPs-2 e -9 e do inibidor RECK como preditores da progressão das lesões cervicais. Estes biomarcadores podem servir como ferramentas valiosas para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas mais precisas e eficazes, contribuindo para a melhoria do prognóstico de pacientes com neoplasias intraepiteliais cervicais.

Em suma, este estudo avança o entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na progressão do câncer cervical e propõe novos alvos para intervenções clínicas. A integração desses biomarcadores em protocolos clínicos pode aprimorar a detecção precoce e o tratamento das lesões cervicais, impactando positivamente a saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento onde a carga da doença é mais pronunciada.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Morfotecnologia (PPGM), ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- AMABEBE, E.; OGIDI, H.; ANUMBA, D. O. Matrix metalloproteinase-induced cervical extracellular matrix remodelling in pregnancy and cervical cancer. **Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. R177–R191, 2022. DOI <https://doi.org/10.1530/RAF-22-0015>.
- AZEVEDO MARTINS, J. M. *et al.* Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 660, 2020. DOI <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07150-3>.
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- CARDEAL, L. B. D. S. *et al.* HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e33585, 2012. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033585>.

CHEN, W. *et al.* Prognostic Role of Matrix Metalloproteinases in Cervical Cancer: A Meta-Analysis. **Cancer Control**, [s. l.], v. 28, p. 107327482110337, 2021. DOI <https://doi.org/10.1177/10732748211033743>.

DE ALMEIDA, L. G. N. *et al.* Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 714–770, 2022. DOI <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000349>.

DISCACCIATI, M. G. *et al.* MMP-9/RECK Imbalance: A Mechanism Associated with High-Grade Cervical Lesions and Genital Infection by Human Papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1539–1547, 2015. DOI <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0420>.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, [s. l.], v. 110, n. 5, p. 525–541, 2006. DOI <https://doi.org/10.1042/CS20050369>.

HERBSTER, S. *et al.* Low RECK Expression Is Part of the Cervical Carcinogenesis Mechanisms. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 2217, 2021. DOI <https://doi.org/10.3390/cancers13092217>.

IBEANU, O. A. Molecular pathogenesis of cervical cancer. **Cancer Biology & Therapy**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 295–306, 2011. DOI <https://doi.org/10.4161/cbt.11.3.14686>.

MATHEUS, E. R. *et al.* MMP-9 expression increases according to the grade of squamous intraepithelial lesion in cervical smears. **Diagnostic Cytopathology**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 827–833, 2014. DOI <https://doi.org/10.1002/dc.23124>.

MEKONNEN, A. G.; MITTIKU, Y. M. Early-onset of sexual activity as a potential risk of cervical cancer in Africa: A review of literature. **PLOS Global Public Health**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. e0000941, 2023. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pgph.0000941>.

SONG, F. B. *et al.* [Clinical value of p16INK4a immunocytochemistry in cervical cancer screening]. **Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi**, [s. l.], v. 55, n. 11, p. 784–790, 2020. DOI <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112141-20200520-00428>.

VIEIRA, G. V. *et al.* Proteases and HPV-Induced Carcinogenesis. **Cancers**, [s. l.], v. 14, n. 13, p. 3038, 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/cancers14133038>.

ZHOU, Y. *et al.* Causal effect of age first had sexual intercourse and lifetime number of sexual partners on cervical cancer. **Heliyon**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. e23758, 2024. DOI <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e23758>.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002. DOI <https://doi.org/10.1038/nrc798>.

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA



Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares



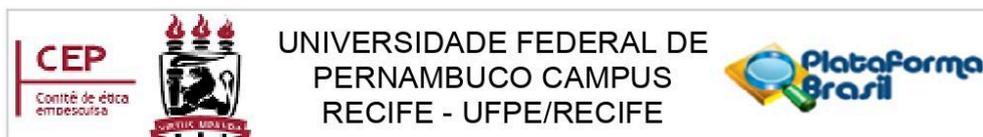
Protocolo para imuno-histoquímica (2024)

Análise de imunoreatividade de diferentes biomarcadores de detecção precoce, diagnóstico, progressão tumoral e prognóstico. Propõe-se a avaliar a intensidade de expressão com gradações em diferentes níveis (sem marcação, fraco, moderado e acentuado).

Protocolo

01 - Desparafinização a seco (60° C).....	24 a 48 horas
02 - Xilol 1.....	10 Minutos
03 - Xilol 2.....	10 Minutos
04 - Álcool 100%.....	05 Minutos
05 - Álcool 90%.....	05 Minutos
06 - Álcool 80%.....	05 Minutos
07 - Álcool 70%.....	05 Minutos
08 - Lavagem em Água Destilada.....	05 Minutos
09 - Lavagem em PBS.....	05 Minutos
10 - Recuperação Antigênica (Tampão Citrato pH 6,0 - 0,01M).....	
10.1 - Pôr 2 cubas com citrato na panela de pressão elétrica (95°C).....	15-30 Minutos
10.2 - Retirar da panela e deixar esfriar em outra cuba com citrato (45-37°C).....	
11 - Lavagem em PBS (2x).....	05 Minutos
12 - Circular área da amostra com caneta hidrofóbica.....	
13 - Solução de Bloqueio (<i>Bloxall</i>).....	30 Minutos
14 - Lavagem em PBS.....	05 Minutos
15 - Soro (<i>Normal Horse Serum, 2,5%</i>).....	60 Minutos
16 - Remover excesso secando perpendicularmente as lâminas.....	
17 - Incubação com Anticorpo Primário (1:50, 1:100, 4° C).....	<i>Overnight</i>
18 - Lavagem em PBS.....	05 Minutos
19 - Incubação com HRP (Horse Anti-Mouse IgG)	30 Minutos
20 - Lavagem em PBS (2x).....	05 Minutos
21 - Solução Reveladora (DAB) (100 uL, 1:1, 1:2, 1:3).....	06-10 Minutos
22 - Lavagem em PBS (2x).....	05 Minutos
23 - Lavagem em Água Destilada.....	05 Minutos
24 - Contra-coloração com Hematoxilina.....	03 Minutos
25 - Lavagem em Água Corrente.....	
26 - Pôr lâminas em estufa para secagem.....	
27 - Montar com Entellan e Laminula.....	

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP N.º 6588679



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise imuno-histoquímica da metaloproteinase-14 e RECK em lesões precursoras e câncer cervical

Pesquisador: EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 74798423.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.588.679

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa para dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Morfotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco de Emmanuel Nóbrega Travassos de Arruda, sob a orientação do Prof. Jacinto da Costa Silva Neto.

Trata-se de um estudo observacional, analítico transversal, que será desenvolvido utilizando amostras em bloco de parafina, oriundas do laboratório de Patologia do

Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A técnica de imuno-histoquímica será realizada no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), bem como a análise das lâminas confeccionadas, visando identificar a relação entre a expressão da metaloproteinase-14 e RECK com o desenvolvimento do câncer cervical, uma vez que, a infecção persistente e duradora pelo HPV, pode influenciar na sua ativação. Dessa forma, o estabelecimento da relação entre a metaloproteinase-14 e o estadiamento da lesão, pode fornecer informações importantes sobre prognóstico e, até mesmo, funcionar como um possível biomarcador.

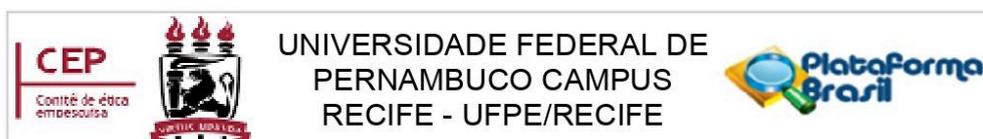
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a expressão imunohistoquímica da metaloproteinase de matriz 14 (MT1-MMP) e RECK, em amostras de lesões e câncer cervical.

Objetivo Secundário:

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.588.679

- Caracterizar as amostras segundo os laudos citológicos e histológicos;
- Investigar a associação entre a expressão imunohistoquímica da MT1-MMP e RECK, com as amostras cervicais e os dados citológicos e histológicos;
- Correlacionar a expressão imunohistoquímica da MT1-MMP e RECK com o grau de desenvolvimento das lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"A resolução n.º 466/12, aborda e regulamenta as diretrizes inerentes ao desenvolvimento de pesquisas envolvendo seres humanos. Neste sentido, o presente projeto, acarreta riscos mínimos aos pacientes envolvidos na pesquisa, uma vez que, não há participação direta dos mesmos em qualquer etapa. Porém, cabe salientar que, a possibilidade, apesar de mínima, de vazamento de qualquer tipo de informação acerca dos envolvidos existe, sendo minimizada pela restrição de acesso de qualquer natureza, como, por exemplo, aos dados obtidos dos prontuários, amostras ou lâminas, de pessoas além do pesquisador e o seu orientador. Faz-se necessário destacar também que, em relação ao processamento imuno-histoquímico, existe risco devido à manipulação de substâncias carcinogênicas (Diaminobenzidina), sendo minimizado pelo uso de proteção facial (óculos e máscara), luvas e vestuário de proteção, além de precauções pós-manuseio, como a lavagem cuidadosa das mãos.

Em relação aos benefícios, são promissores, uma vez que, havendo associação significativa entre os resultados da imuno-histoquímica e as lesões cervicais, será possível estabelecer um biomarcador importante para a conclusão diagnóstica, avaliação prognóstica e escolha do tratamento pelo profissional médico."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto pode trazer uma boa contribuição para a ciência, no que diz respeito as lesões teciduais induzidas pelo papiloma vírus humano (HPV).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão em conformidade com as normas do CEP.

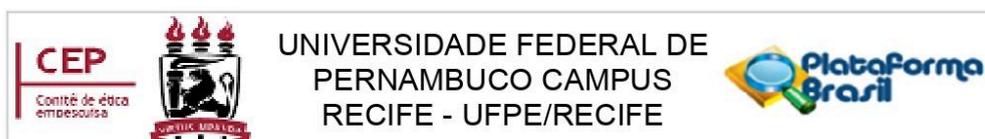
Recomendações:

Sem Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.588.679

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da pesquisa da qual participaram.

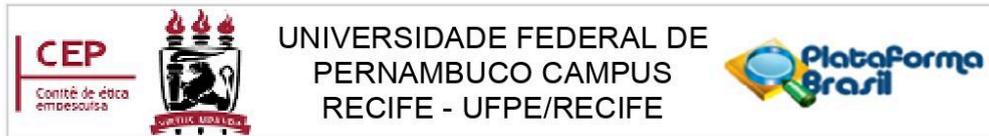
Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final disponível em www.ufpe.br/cep para enviá-lo via Notificação de Relatório Final, pela Plataforma Brasil. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado. Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2214854.pdf	16/12/2023 15:13:48		Aceito
Outros	Carta_resposta_assinado2.pdf	16/12/2023 15:13:05	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_cep3_Emanuel.pdf	16/12/2023 15:12:06	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_dispenza_TCLE_corrigida_assinado.pdf	01/12/2023 15:28:49	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Anuencia_patologia.pdf	01/12/2023 14:26:34	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito

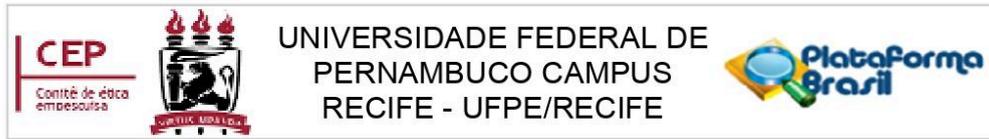
Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.588.679

Outros	Julia.pdf	05/10/2023 15:29:08	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Emmanuel.pdf	05/10/2023 15:28:50	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	declaracao_20231008530.pdf	05/10/2023 14:18:06	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Declaração de concordância	Carta_anuencia_NDC_Emmanuel_assinado.pdf	05/10/2023 10:48:08	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_Emmanuel_assinada_assinado.pdf	01/10/2023 09:59:57	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Termo_confidencialidade_Emmanuel.pdf	29/09/2023 15:10:33	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Jacinto1.pdf	29/09/2023 14:40:45	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Juliano.pdf	29/09/2023 14:40:29	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Helbert.pdf	29/09/2023 14:39:26	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Isa.pdf	29/09/2023 14:39:12	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Outros	Gabriel.pdf	29/09/2023 14:38:48	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito
Orçamento	Orcamento_CEP.pdf	27/09/2023 15:27:10	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE	Aceito

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.588.679

Orçamento	Orcamento_CEP.pdf	27/09/2023 15:27:10	ARRUDA	Aceito
Cronograma	Cronograma_CEP.pdf	27/09/2023 15:23:51	EMMANUEL NOBREGA TRAVASSOS DE ARRUDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 18 de Dezembro de 2023

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br