



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto Mestrado
Acadêmico



**EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SEUS
INBIDORES ENDÓGENOS EM CÂNCER DE PÊNIS:
ESTUDOS CLÍNICO-PATOLÓGICO E A RELAÇÃO COM A
INFECÇÃO PELO HPV**

FLÁVIA MENDONÇA LIMA BATISTA

**São Luís
2022**

FLÁVIA MENDONÇA LIMA BATISTA

**EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SEUS
INBIDORES ENDÓGENOS EM CÂNCER DE PÊNIS:
ESTUDOS CLÍNICO-PATOLÓGICO E A RELAÇÃO COM A
INFECÇÃO PELO HPV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Saúde do adulto.

Área de concentração: Processos biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: HPV e câncer

Orientadora: Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira

Co-orientadora: Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito

Coordenador: Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

São Luís

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo (a) autor (a). Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Mendonça, Flávia.

EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SEUS INBIDORES
ENDÓGENOS EM CÂNCER DE PÊNIS: ESTUDOS CLÍNICO-PATOLÓGICO E A RELAÇÃO COM
A INFECÇÃO PELO HPV / Flávia Mendonça. 2022.
129 p.

Coorientador (a): Haissa Brito.

Orientador (a): Rui Miguel Gil Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do
Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. Câncer de pênis. 2. Estadiamento tumoral. 3. HPV.
4. Metaloproteinasas. 5. TIMPs. I. Brito, Haissa. II.
Oliveira, Rui Miguel Gil. III. Título.

FLÁVIA MENDONÇA LIMA BATISTA

**EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E SEUS
INBIDORES ENDÓGENOS EM CÂNCER DE PÊNIS:
ESTUDOS CLÍNICO-PATOLÓGICO E A RELAÇÃO COM A
INFECÇÃO PELO HPV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Qualificação de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito (Coorientadora)

Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade

(Examinador) Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof.^a Dra. Flávia Castello Branco Vidal Cabral

(Examinador) Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof.^a Priscila de Souza

(Examinador) Universidade do Vale do Itajaí

Prof.^a Dra. Maria do Socorro Sousa Cartagenes

(Suplente) Universidade Federal do Maranhão

À minha Luísa.

Maior e melhor presente que
Deus podia me dar. Tudo
isto é por ela e para ela,
assim como o meu amor.

AGRADECIMENTOS

Aprendi desde muito cedo com meu pai que o único caminho certo na vida era o estudo. Ele costumava dizer que de tudo poderia me faltar, mas ele jamais deixaria faltar a educação. E assim, certo de que me deixaria a melhor herança que poderia deixar, construiu uma escada firme para que eu pudesse subir até aqui. Quis a vida que ele não estivesse mais entre nós para receber este agradecimento em vida, mas que ele possa sentir em algum lugar a minha eterna e profunda gratidão.

Em meio a uma caminhada difícil como esta, por muitas vezes a única força que nos sustenta é a fé e o amor de Deus. É Ele que constrói caminhos seguros e certos e nos dá luz e sabedoria para seguirmos em frente. É Ele que da forma mais simples e perfeita, lapida a nossa essência para que possamos alcançar o verdadeiro crescimento. A Ele todo meu amor, louvor e gratidão!

Durante esta caminhada, recebi em meu ventre o dom da vida. O maior amor que pude conhecer, a minha Luísa. Ela foi o meu combustível, a minha mola propulsora e com seu sorriso iluminou o meu mundo e deu sentido a esta jornada.

À minha mãe Iolanda, fonte de amor inesgotável. Foi ela que com a sua perseverança me fez acreditar no impossível e me impediu por muitas vezes de desistir. Ela é minha fonte de inspiração por tamanha fortaleza que soube ser para mim.

Ao meu esposo Marcus Vinícius, a mais verdadeira forma de amor carnal que conheci na vida, maior exemplo vivo de lealdade, honestidade e luta que pude ter. Com quem aprendi que acreditar é uma virtude dos vencedores. A ele, que construiu pontes e caminhos para tornar esse sonho possível, dedico todo o meu amor.

Ao meu querido amigo, compadre e quase irmão, Aruanã Costa, por ter sido fonte de inspiração e incentivo. Foi ele quem me conduziu a este caminho e aqui estou. A minha mais sincera e profunda gratidão.

À Sinara Freire, por sua amizade, companheirismo e lealdade. Por tantas vezes que generosamente despiu-se de si para vestir-se de mim e assim me ajudou a atravessar os obstáculos do caminho, minha eterna gratidão.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira, por ser calma em meio a tempestade. Por ter me acolhido no sentido real da palavra. Minha sincera gratidão pela valiosa oportunidade de ter sido sua orientanda e ter aprendido com você muito além da pesquisa. Obrigada por todo o apoio e incentivo, por não medir esforços para o desenvolvimento desta pesquisa e por estar sempre disposto a aprimorar o meu trabalho com seu conteúdo.

À minha coorientadora Prof.^a Dra. Haissa Oliveira Brito, obrigada por ter sido o coração acolhedor de mãe que me ajudou a enfrentar todas as dificuldades. Que Deus te abençoe infinitamente.

À Prof.^a Luciane Brito, pelo curto tempo que tivemos de convivência e pelo legado deixado, através do qual é proporcionada grande contribuição para a ciência, como este trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio L. Cubilla, pelo apoio, incentivo e colaboração na análise de subtipos histológicos.

Ao Instituto Português de Oncologia do Porto, nas pessoas do Prof. Doutor Rui Medeiros e do Doutor Hugo Sousa, pelo apoio na determinação dos tipos de HPV presentes em amostras penianas.

À querida Prof.^a Dra. Elda Pereira Noronha por incrementar com seus conhecimentos nas análises estatísticas do nosso trabalho. A ela minha gratidão.

À Prof.^a Dra. Flávia Vidal, por nos doar o seu dom de ensinar, pela sua paciência e disponibilidade em contribuir para o desenvolvimento de um excelente estudo.

À Jordana Soeiro, o laço mais fraterno que cultivei na vida; a amiga especial que Deus colocou em meu caminho porque eu precisava dela. Obrigada por estar comigo em todos os momentos dessa caminhada e de tantas outras.

Aos queridos colegas que fazem parte do grupo de pesquisa professora Luciane Brito: Amanda Teles, Fabrício Viana, Lourdes e Katherine. Cada linha deste trabalho tem a contribuição de vocês. Obrigada por terem sido a mão estendida nas situações em que pensei que não iria conseguir.

Aos colegas de turma que se tornaram amigos especiais, Iagho José e Isabela Sena, obrigada pelos sorrisos diários, pela parceria e ajuda mútua. Vocês cativaram um espaço definitivo no meu coração.

Aos funcionários do SAME dos Hospitais Aldenora Bello, Presidente Vargas e Tarquínio Lopes Filho, em especial à enfermeira Cleide, pela ajuda, disponibilidade e colaboração intensa na coleta das amostras e no levantamento dos prontuários dos pacientes.

À Prof.^a Dra. Maria do Desterro, Sr. José, Sr. Emanuel e toda a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, pelo apoio e ajuda ao solucionarmos dificuldades ao longo desta jornada.

Ao Banco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA), onde foi possível realizar algumas etapas da pesquisa.

À UFMA, junto ao programa PPGSAD.

A todos os pacientes que sofrem o calvário do enfrentamento desta doença tão devastadora, em especial aqueles que aceitaram contribuir com este estudo, o meu profundo respeito e gratidão. Que esta pesquisa possa representar um sopro de vida a vocês.

Começamos a entender que o universo que temos como nosso pode ser considerado como um organismo vivo no qual cada uma das células trabalha em equilibrada cooperação com as outras, a fim de manter uma coerência de conjunto. Se uma dessas células falhar e a doença se instalar, esse equilíbrio é posto em questão. É a totalidade do sistema que está em risco. Isso nos sugere que nosso bem-estar individual está intimamente ligado aos outros indivíduos e ao ambiente em que evoluímos.

(Dalai Lama)

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE QUADROS.....	15
LISTA DE GRÁFICOS	16
Introdução.....	19
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Câncer de pênis	20
2.1.2 Aspectos clínicos e histopatológicos do câncer de pênis	22
TABELA 1.....	25
2.2 Papilomavírus Humano (HPV).....	29
2.2.1 Fisiopatologia da infecção pelo HPV e o câncer	31
2.2.2 Classificação dos tipos de HPV	34
2.3 Metaloproteinases da matriz extracelular	35
2.3.1 Regulação das MMPs.....	37
2.3.2 MMP's e o câncer	39
2.3.3 HPV e a regulação da expressão e atividade das MMP's	41
3. OBJETIVOS	42
3.1 Geral.....	42
3.2. Específicos	42
4. METODOLOGIA.....	43
4.1 Tipo e Local de estudo	43
4.2 Critérios de inclusão/exclusão	43
4.4 Coleta de dados	44
4.5 Coleta e processamento das amostras	44
4.6 Análise, processamento de dados e testes estatísticos	49
4.7 Aspectos éticos	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Análise das variáveis clínico-patológicas.....	50
TABELA 2.....	50
TABELA 3.....	51
TABELA 4.....	52
5.2 Detecção e identificação de tipos de HPV presente	53
GRÁFICO 3: Detecção de DNA viral do HPV nas amostras	54
TABELA 6.....	54

TABELA 7: Associação entre o grau de escolaridade e a presença ou ausência de HPV nas amostras.....	55
TABELA 8.....	56
TABELA 9.....	56
TABELA 10: Associação entre o grau de Broders e a infecção pelo HPV	56
TABELA 11.....	56
TABELA 12.....	56
TABELA 13.....	57
5.3 Estudo da expressão das Metaloproteinases e Timp's	57
6. DISCUSSÃO	82
CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	88

RESUMO

O câncer de pênis (CP) faz parte dos tumores que acometem o sexo masculino, com crescente incidência no Brasil e no mundo, especialmente no estado do Maranhão. Este câncer apresenta grande capacidade de invadir localmente e metastatizar para os linfonodos regionais, o que constitui o fator prognóstico mais importante, pois as metástases nos linfonodos regionais e a profundidade da invasão reduzem muito a sobrevivência do paciente. O presente trabalho justifica-se pela necessidade de compreender os fatores que condicionam a capacidade invasora do câncer de pênis, dentre eles a regulação das MMPs 2 pelos TIMPs 2 e 3 e a relação que esta regulação apresenta com a progressão deste câncer, condicionando a capacidade invasora das células tumorais. O objetivo geral foi analisar a expressão de metaloproteinases (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) no desenvolvimento do câncer de pênis HPV+ e HPV- através de estudos morfológicos e moleculares. Trata-se de um estudo epidemiológico, do tipo analítico, quantitativo, retrospectivo e seccional de série histórica de casos de carcinomas epidermóides penianos, realizado em 75 amostras de tumores penianos armazenados no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Dados sociodemográficos foram obtidos através de um questionário, dados clínicos e histopatológicos foram coletados por meio de análise de prontuário. O DNA genômico das amostras foi extraído e realizada a reação em cadeia de polimerase PCR/Nested para detecção do HPV e em seguida a eletroforese em gel de agarose. Amostras positivas foram submetidas a genotipagem pelo método Anyplex para identificação do tipo viral. Para análise da expressão das MMPs 2 e dos TIMPs 2 e 3 foi realizada PCR em tempo real. Observou-se que a média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de aproximadamente 64 anos. A maioria (64,76%) era procedente do interior do Maranhão e consideravam-se pardos (62,67%). Observou-se ainda que 44,44% dos pacientes eram casados, 30,56% dos pacientes tinham ensino fundamental incompleto e 26,30% era analfabeto. Quando questionados sobre os hábitos de vida, a maioria dos pacientes (51,61%) afirmou nunca usa camisinha (63,51) que fuma ou já fumou durante a vida. A maioria (81,09%) também afirmou que já foi etilista ou ainda é. Foi observado também neste estudo que 49% das amostras eram positivas para o HPV, sendo que o HPV 16 estava presente em 36% e o HPV 11 em 49% das amostras. A expressão de genes analisada neste estudo demonstrou uma associação entre o câncer de pênis, a infecção pelo HPV e a diminuição da expressão do TIMP3 ($p = 0,0360$ entre tumores HPV+ e HPV-). Com estes resultados podemos concluir que há uma relação entre alguns hábitos de vida dos pacientes e o câncer peniano, bem como uma associação importante com a infecção pelo HPV. E ainda, que há uma relação entre o câncer de pênis HPV+ e a desregulação da expressão de MMP, proporcionada pela reduzida atividade de TIMP3.

Palavras-chave: Câncer de pênis. Metaloproteinases. HPV. TIMPs. Estadiamento tumoral

ABSTRACT

Penile cancer (PC) is one of the most common male tumors, with a high incidence in Brazil and worldwide, especially in the state of Maranhão. This cancer has a great capacity to invade locally and metastasize to regional lymph nodes, which is the most important prognostic factor, since metastasis to regional lymph nodes and the depth of invasion greatly reduce patient survival. This study is justified by the need to understand the factors that condition the invasive capacity of penile cancer, among them the regulation of MMPs 2 by TIMPs 2 and 3 and the relationship that this regulation has with the progression of this cancer, conditioning the invasive capacity of tumor cells. The overall objective was to analyze the expression of metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in the development of HPV+ and HPV- penile cancer through morphological and molecular studies. This is an epidemiological, analytical, qualitative, retrospective and sectional study of historical series of cases of penile epidermoid carcinomas, performed on 75 samples of penile tumors stored in the Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Sociodemographic data were obtained through a questionnaire, clinical and histopathological data were collected through medical record analysis. The genomic DNA of the samples was extracted and polymerase chain reaction PCR/Nested for HPV detection and then electrophoresis in agarose gel. Positive samples were submitted to genotyping by the Anyplex method for viral type identification. To analyze the expression of MMPs 2 and TIMPs 2 and 3 real-time PCR was performed. It was observed that the mean age of patients at diagnosis was approximately 64 years. Most (64.76%) were from the interior of Maranhão and considered themselves to be brown (62.67%). It was also observed that 44.44% of patients were married, 30.56% had incomplete elementary school education, and 26.30% were illiterate. When asked about lifestyle habits, most patients (51.61%) said they never use condoms (63.51) that they smoke or have smoked during their lifetime. The majority (81.09%) also stated that they have been or still are alcoholics. It was also observed in this study that 49% of the samples were positive for HPV, with HPV 16 present in 36% and HPV 11 in 49% of the samples. The gene expression analyzed in this study showed an association between penile cancer, HPV infection and decreased expression of TIMP3 ($p = 0,0360$ entre tumores HPV+ e HPV-). With these results we can conclude that there is a relationship between some lifestyle habits of patients and penile cancer, as well as an important association with HPV infection. And also, that there is a relationship between HPV+ penile cancer and the downregulation of MMP expression, provided by the reduced expression of TIMP3.

Keywords: Penile cancer. Metalloproteinases. HPV. TIMPs. Staging tumoral

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Classificação da Organização Mundial de Saúde - OMS (2016) dos Carcinomas de células escamosas (CCE) de pênis.	24
TABELA 2: Perfil sociodemográfico dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão.	48
TABELA 3: Hábitos de vida dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão.	50
TABELA 4: Hábitos de higiene na região peniana em pacientes com câncer de pênis no estado do Maranhão.	50
TABELA 5: Características histopatológicas das amostras com câncer de pênis no estado do Maranhão.	51
TABELA 6: Frequência dos tipos de HPV identificados nas amostras.	53
TABELA 7: Associação entre o grau de escolaridade e a presença ou ausência de HPV nas amostras.	53
TABELA 8: Associação entre o tabagismo e a presença ou ausência de HPV nas amostras.	54
TABELA 9: Associação entre o etilismo e a presença ou ausência de HPV nas amostras.	54
TABELA 10: Associação entre o grau de Broders e a infecção pelo HPV.	55
TABELA 11: Associação entre a invasão perineural do tumor e a presença de HPV na amostra.	55
TABELA 12: Associação entre a invasão angiolinfática do tumor e a presença de HPV na amostra.	55
TABELA 13: Associação entre estadiamento do tumor e a presença de HPV na amostra.	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Composição do DNA circular do HPV e suas competências na patogênese do vírus.	30
Figura 2 - Modelo simplificado que ilustra as principais desregulações induzidas pelos oncogenes virais E6 e E7.	31
Figura 3 - Esquema da infecção por HPV, mostrando a expressão diferencial dos diferentes genes virais nas diferentes camadas do epitélio.	32
FIGURA 4 - Esquema estrutural das diversas famílias de metaloproteinases da matriz.	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação de Grau de Broder's.	25
Quadro 2 – Sistema de classificação TNM.	26
Quadro 3 – Classificação de Jackson para o estadiamento do câncer de pênis	27
Quadro 4 - Definição de estágio do câncer de pênis pela Classificação TNM.	27
Quadro 5 – Envolvimento das metaloproteinases nos diversos tipos de câncer e respectiva alteração celular promovida.	39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Presença ou ausência de DNA viral do HPV nas amostras.	52
GRÁFICO 2: Frequência dos tipos de HPV identificados nas amostras.	53
GRÁFICO 3: Presença ou ausência de DNA viral do HPV nas amostras.	54
Gráfico 4. Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de MMP2 em amostras de CP e de tecido adjacente.	56
Gráfico 5. Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP e de tecido adjacente.	57
Gráfico 6. Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP e de tecido adjacente.	58
Gráfico 7. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) das MMP2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.	59
Gráfico 8. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) das MMP2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.	60
Gráfico 9. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) das MMP2 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.	61
Gráfico 10. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) das MMP2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.	61
Gráfico 11. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) das MMP2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.	62
Gráfico 12. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) das MMP2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.	62
Gráfico 13. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.	63
Gráfico 14. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.	64
Gráfico 15. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.	64
Gráfico 16. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.	65
Gráfico 17. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.	65
Gráfico 18. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.	66

Gráfico 19. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.	67
Gráfico 20. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo.	67
Gráfico 21. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.	68
Gráfico 22. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP com e sem invasão perineural.	68
Gráfico 23. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP com e sem invasão angiolinfática.	69
Gráfico 24. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.	69
Gráfico 25. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP com TNM alto e baixo.	70
Gráfico 26. Níveis expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

HPV	Papilomavírus Humano
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
BM	Membrana Basal
α 2M	α 2-macrogobulin
TIMPs	Inibidores de Tecidos de Metaloproteinases
ASR	“age standardised rate” - Incidência Padronizada para a Idade
CEC	Carcinoma Epidermóide de Células Escamosas
LNs	Linfonodos
AJCC	Comitê Americano sobre o Câncer
NOS	Não Especificados de Outra Forma
UICC	União Internacional para o Controlo do Cancro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
LCR	Long Control Region
ORI	Origem de Replicação
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Open Reading Frames
pRb	Proteína do Retinoblastoma
miRNA	microRNAs
PV	Papilomavírus
PeINsN	Neoplasia intraepitelial peniana
EV	Epidermodisplasia Verruciforme
MT-MMPs	Metaloproteinases do tipo membrana
PEA-3	Polioma Proteína-3
EMT	Transição Epitelial para Mesenquimal
NIC's	Neoplasias Intra-epiteliais Cervicais
BM	Membrana Basal
IHC	Imuno-Histoquímica

Introdução

O câncer representa uma das principais causas de morte na população mundial. No ano de 2020, tivemos um número de 19 milhões de casos de câncer notificados e 10 milhões de mortes associadas a doença no mundo (Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer, 2020). O grande impacto do câncer diz respeito a morbidade e mortalidade de pacientes, relacionada muitas vezes com as metástases, com a natureza sistêmica da doença e ainda com a resistência das células metastáticas aos agentes terapêuticos existentes (GONZALEZ-AVILA et al, 2019).

Entre os vários tipos de câncer catalogados, o câncer peniano faz parte dos tumores que acometem o sexo masculino. Constitui uma doença rara, que apresenta maior incidência em países subdesenvolvidos, onde o câncer peniano pode ser responsável por até 10% dos cânceres entre homens (ALEMANY et al., 2016). No Brasil, a condição pode ser responsável por 2,1% de todas as neoplasias nos homens e afeta principalmente os habitantes das regiões Norte e Nordeste (COELHO et al., 2018). Neste cenário o Maranhão se destaca como estado de maior incidência deste câncer (estimada em 6.15 por 100.000 habitantes), fato associado a grande desigualdade social e extrema pobreza verificada na região (COELHO et al., 2018).

O câncer é uma doença complexa e multifatorial que conta com diversas vias de sinalização moleculares envolvidas na sua fisiopatologia. Para o câncer de pênis, destacamos a participação de uma família de proteases da matriz extracelular (MEC), conhecidas como metaloproteinases da matriz (MMPs) (CAMPOS et al., 2006; SOARES et al., 2006).

MMPs ou matrixinas são um grupo de endopeptidases capazes de perturbar todas as moléculas da membrana basal (BM) e matriz extracelular (ECM). Participam de diversos eventos fisiológicos, como por exemplo inflamação, embriogênese, cicatrização de feridas, angiogênese e remodelação óssea, mas também em doenças como o câncer (GONZALEZ-AVILA et al, 2019). Na verdade, as MMPs medeiam vários processos biológicos críticos envolvidos nas características do câncer, como migração celular, diferenciação, proliferação, apoptose, reações inflamatórias, angiogênese e agregação plaquetária (HADLER-OLSEN, 2013).

Ao longo dos anos, a superexpressão e / ou alta atividade enzimática de várias MMPs foi correlacionada com o aumento da agressividade de várias doenças

malignas, apoiando o potencial das MMPs como marcadores de prognóstico em pacientes com câncer (GONZALEZ-AVILA et al, 2019; YADAV et al 2014). Essa característica é de particular importância no que diz respeito a morbidade e mortalidade observada no câncer de pênis, visto que o acometimento linfonodal representa o comprometimento mais importante da doença, ocasionando uma cirurgia mais invasiva e consequentemente, uma morbidade maior.

Segundo Kim e Joh, (2012), a atividade proteolítica das metaloproteinases pode ser regulada de diversas formas, sendo uma delas a inibição enzimática. Há dois grupos de inibidores endógenos da atividade das metaloproteinases: α 2-macrogobulin (α 2M) e os inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMPs) (GONZALEZ-AVILA et al, 2019). Em relação a regulação feita pelos TIMPs, destacamos a participação dos TIMPS 1, 2 e 3 na inibição da atividade enzimática que envolve a participação das MMPs 2 e 9 (GONZALEZ-AVILA et al, 2019). No câncer de pênis, a expressão aumentada de metaloproteinases, particularmente da MMP2 e MMP9, está relacionada com um comportamento agressivo e com a recorrência local da doença após a cirurgia (CAMPOS et al., 2006; SOARES et al., 2006). No entanto, nenhum estudo até o presente momento, investigou a regulação das metaloproteinases no câncer de pênis através dos TIMPs.

A hipótese apresentada por este estudo é a de que a regulação das MMPs 2 e 9 é realizada pelos TIMPs 1, 2 e 3 no câncer de pênis e que esta regulação é importante para a progressão deste câncer, condicionando a capacidade invasora das células tumorais. Este estudo poderá contribuir para esclarecer os mecanismos de progressão deste tipo de câncer bem como para validar as MMPs como um potencial alvo terapêutico no câncer de pênis, uma vez que já existem fármacos aprovados para uso em outras patologias com capacidade de inibir as MMPs, a exemplo da doxíciclina (CORBITT et al., 2007).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Câncer de pênis

O câncer de pênis representa uma patologia geniturinária agressiva e mutilante com devastadores efeitos físicos e psicológicos e elevado grau de morbidade associada, impactando de maneira direta na autoestima do paciente. Embora possa afetar homens de qualquer idade, é mais comum ser diagnosticado nas 6ª e 7ª décadas de vida (DOUGLAWI; MASTERSON, 2019).

É considerado doença rara na Europa e na América do Norte, onde é responsável por apenas 0,4% a 0,6% de todos os cânceros. A incidência é mais elevada nos países menos desenvolvidos, aonde pode chegar até 6,15 novos casos por 100.000 habitantes, de acordo com dados recentes (COELHO et al., 2018).

Estima-se que no total 36.068 novos casos tenham ocorrido em todo o mundo em 2020 (MEDEIROS-FONSECA et al., 2021). O aumento do número de casos observado predominantemente em países subdesenvolvidos, inclui o Brasil e representa uma grande preocupação no cenário epidemiológico do país (COELHO et al., 2018; COUTO et al., 2014; FAVORITO et al., 2008). O diagnóstico precoce torna o câncer de pênis uma entidade clínica altamente curável. Entretanto, o maior obstáculo para que isso ocorra é a demora do paciente em procurar atendimento médico (PORTH, 2010).

O Brasil tem uma das maiores incidências de cancro peniano a nível mundial. A sua incidência é muito mais elevada do que a dos Estados Unidos e da Europa (HELLER, 2016; MORRIS et al, 2011), assemelhando-se apenas a outras nações em desenvolvimento como a Índia, certos países africanos e outras nações sul-americanas (CHRISTODOULIDOU et al, 2015; MISRA et al, 2004). Contudo, existe variabilidade mesmo dentro do Brasil, onde o número mais elevado de casos é relatado na região Nordeste (FAVORITO et al, 2008). A incidência nesta região é de 5,7%, ultrapassando a região economicamente mais desenvolvida - Sudeste (1,2%) - e o Norte (3,8%), a segunda região mais pobre (VIEIRA et al, 2020). Temos um número particularmente elevado de doentes com câncer de pênis no estado do Maranhão, que tem a maior incidência reportada a nível mundial (incidência padronizada para a idade, “age standardised rate” - ASR de 6,1 casos por 100.000 habitantes) e é a região menos desenvolvida do Brasil, onde identificamos elevadas taxas de infecção por HPV (VIEIRA et al, 2020; COELHO et al., 2018).

O Maranhão é o estado mais pobre do país, com um rendimento per capita de R\$ 803,73 e um Humano Índice de desenvolvimento de 0,63912, sendo este o segundo pior IDH do Brasil. Estes fatores, juntamente com a elevada taxa de habitantes rurais, distância de grandes centros de saúde, e pouca ou nenhuma escolaridade, fornecem as características ideais para o desenvolvimento do cancro peniano. Além disso, há uma elevada prevalência do HPV na população geral do estado (VIEIRA et al. 2020; COELHO et al., 2018).

A maioria dos processos carcinogênicos exibem duas vertentes

fisiopatológicas: uma delas ligada a fatores genéticos e a outra ligada a fatores ambientais, que consistem algumas vezes em hábitos de vida inadequados, configurando assim os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da patologia. No câncer de pênis já foram elencados alguns fatores associados ao maior risco de desenvolvimento da doença. Segundo estudo de ALEMANY et al., (2016), baixas condições socioeconômicas, histórico de fimose, tabagismo, inflamações crônicas e doenças sexualmente transmissíveis (especialmente aquela causada pelo papilomavírus humano - HPV) seriam os fatores de risco envolvidos (ALEMANY et al., 2016; COUTO et al., 2014). Tem havido recentemente interesse no papel dos fatores moleculares na oncogênese e no prognóstico do cancro do pênis. Muitos destes marcadores são intimamente associadas à infecção por HPV, particularmente com variantes de alto risco (DOUGLAWI; MASTERSON, 2019).

A maioria das neoplasias malignas de pênis é constituída pelo tipo histológico carcinoma epidermóide, também chamado espinocelular ou escamoso (CEC), correspondendo a mais de 95% dos casos. O CEC é derivado do epitélio estratificado escamoso, presente tanto na glândula como no sulco coronário e prepúcio (SOARES et al., 2006). Uma das características clínicas mais prevalentes deste câncer é a sua capacidade de invadir localmente e metastizar para os linfonodos regionais. A isso se refere o estadiamento do tumor e constitui o fator prognóstico mais importante, pois as metástases nos linfonodos regionais e a profundidade da invasão reduzem muito a sobrevivência do paciente (SOARES et al., 2006).

Os CEC incluem tumores associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e tumores sem evidência de infecção pelo HPV. A nível mundial, a percentagem de tumores associados ao HPV parece encontrar-se entre os 30% e os 50% (ALEMANY et al., 2016). No entanto, a prevalência da infecção pelo HPV varia muito de região para região e, no Maranhão, os CEC associados ao HPV representam cerca de 66,9% do total. (DE SOUSA et al., 2015), sendo mais comuns os tipos de HPV 16 e 18, considerados de alto risco para o desenvolvimento de câncer (ALEMANY et al., 2016).

2.1.2 Aspectos clínicos e histopatológicos do câncer de pênis

Os cânceres de pênis tradicionalmente começam como pequenas lesões, mais comumente na glândula ou no prepúcio, caracterizadas por poucas pápulas, úlcera persistente ou ainda por tumoração que podem se estender

para o sulco coronal, corpo peniano, frênulo e meato uretral (BLEEKER et al., 2009). A aparência das lesões pode variar muito. Algumas aparecem como massas exofíticas cinza-brancas crescendo na pele do pênis e outras podem ser planas, de cor avermelhada e massas ulceradas. Essas lesões crescem lentamente lateralmente ao longo da superfície da pele do pênis e frequentemente cobrem toda a glândula ou prepúcio antes de invadir o corpo e a haste do pênis. As taxas de crescimento das lesões ulcerativas versus exofíticas são semelhantes, embora as lesões ulcerativas pareçam metastatizar para os linfonodos (LNs) mais cedo (ENGELSGJERD; LAGRANGE, 2021).

A confirmação diagnóstica do tumor peniano é feita por meio do exame histopatológico. Na presença de fimose, é necessária incisão dorsal do prepúcio para melhor exposição da lesão. Recomenda-se que a biópsia seja feita preferencialmente na porção central da lesão e em profundidade (POMPEO et al., 2006).

O diagnóstico precoce é de grande relevância para o prognóstico favorável. O paciente que é diagnosticado tardiamente em geral apresenta um grau de invasão tumoral importante, com comprometimento linfonodal, sendo necessário neste caso um tratamento cirúrgico mais invasivo, que inclui a linfadenectomia, além da penectomia. O diagnóstico precoce diminui, portanto, a morbidade e mortalidade associadas a invasão tumoral (COELHO et al., 2018).

A vasta maioria dos carcinomas de pênis humano são carcinomas espinocelulares, e entre estes, um número de subtipos especiais são reconhecidos, considerando as características histológicas microscópicas (MEDEIROS-FONSECA et al., 2021). Para o Comitê Americano sobre o Câncer (AJCC) existem os seguintes subtipos de CCE: sarcomatóide, usual, basalóide, papilar, verrucoso, condilomatoso e misto (CHAUX et al., 2010b; CUBILLA et al., 2017).

Existe uma via carcinogênica bimodal descrita para o câncer de pênis: dependente e não dependente de HPV (GREGOIRE et al, 1995; RUBIN et al, 2001). O carcinoma espinocelular usual, geralmente sem relação com o HPV, é o subtipo mais comum. Existem outras variantes clínicas e morfologicamente distintas, tais como o carcinoma pseudo-hiperplásico (CUBILLA et al, 2004) que ocorre em doentes mais

velhos com líquenes de longa data esclerose e o carcinoma pseudoglandular (CUNHA et al, 2009), uma variante agressiva que simula adenocarcinomas. O carcinoma verrucoso é uma neoplasia geralmente não metastásica de baixo grau em sua versão pura, mas quando misturado com o subtipo usual é classificado como carcinoma verrucoso híbrido e tem potencial metastático (KRAUS; PEREZ-MESA, 1966; EPSTEIN et al, 2020). Carcinoma cuniculatum é um tumor raro, de baixo grau e profundamente invasivo, com um padrão de crescimento labiríntico e sem potencial metastático que é considerado uma variante do carcinoma verrucoso (BARRETO et al, 2007).

Outros tipos de tumor normalmente não relacionados com HPV são os papilares não especificados de outra forma (NOS) (CHAUX et al, 2010^a) de bom prognóstico, o carcinoma adenoescamoso e os carcinomas sarcomatóides (VELAZQUEZ et al.,2005), este último tem o pior prognóstico entre todos os carcinomas penianos. Existem ainda carcinomas mistos em que mais de um tipo está presente no mesmo espécime (EPSTEIN et al, 2020).

Dentre os tumores de pênis relacionados com o HPV os mais comuns são os basalóides, com uma elevada taxa de metástases nodais (CUBILLA et al., 1998) e os carcinomas condilomatosos, raramente associado à propagação regional (CUBILLA et al, 2000). O carcinoma espinocelular do pênis relacionado com HPV apresenta características morfológicas distintas que podem ser muitas vezes reconhecidas com colorações patológicas de rotina, compreendendo 30% a 50% de todos os carcinomas penianos (CUBILLA et al, 2018). Existem outras variantes associadas ao HPV como o carcinoma basalóide-verrugoso (CHAUX et al, 2010c) , geralmente exibindo partes iguais de basalóide e carcinoma de verrugas, e o menos comum dos papilarbasalóides (CUBILLA et al., 2012) e ainda os carcinomas de células claras (SANCHEZ et al, 2016). As variantes tumorais incomuns relacionadas com o HPV são o tipo semelhante ao linfóepitelioma (MENTRIKOSKI et al., 2014) e o carcinoma medular (CAÑETE-PORTILLO et al., 2017).

TABELA 1: Classificação da Organização Mundial de Saúde - OMS (2016) dos Carcinomas de células escamosas (CCE) de pênis.

CCE não relacionada ao HPV	CCE relacionada ao HPV	Outros
Carcinoma de célula escamosa (CCE)	Carcinoma Basalóide	Carcinoma
Carcinoma Usual	Carcinoma Basalóide-Papilar	não classificado
Carcinoma Pseudohyperplástico	Carcinoma condilomatoso	
Carcinoma Pseudoglandular	Carcinoma Condilomatoso-Basalóide	
Carcinoma Verrucoso	Carcinoma de célula clara	
Carcinoma verrucoso Puro	Carcinoma do tipo Linfoepitelioma	
Carcinoma Cuniculatum		
Carcinoma Papilar, NOS		
Carcinoma Adenoescamoso		
Carcinoma Sarcomatoide Escamoso		
Carcinoma Misto		

Fonte: CUBILLA et al., 2018

Os sarcomas penianos são cada vez mais raros e normalmente afetam os corpos cavernosos. O Leiomiossarcoma é o tipo mais comum (FETSCH et al., 2004). Os tumores metastáticos que afetam o pênis são raros, com apenas 529 casos notificados até 2016. Os carcinomas da próstata e da bexiga são os locais primários mais comuns (71%), seguidos do trato gastrointestinal (19%), pulmões (5%) e osso (1%). Quando o pênis é acometido por uma metástase de outro câncer, o corpo cavernoso é o local mais comumente afetado, mas outras áreas como o corpo esponjoso, a fásia peniana ou o prepúcio também pode estar envolvido (EPSTEIN et al, 2020).

Com relação ao processo de invasão tumoral, é importante notar que existe um padrão previsível e gradual para a progressão metastática do câncer do pênis (CHAUX et al., 2011). A drenagem linfática ocorre principalmente para linfonodos inguinais superficiais, depois para os linfonodos inguinais profundos e para os gânglios linfáticos ilíacos na pélvis, e as metástases desenvolvem-se nesta ordem (HAKENBERG et al., 2015; CHAUX et al., 2011; SRINIVAS et al 1987). Posteriormente, outros linfonodos (por exemplo, para-aórticos, mediastinais) são afetados e a disseminação regional para a pele do púbis e da virilha, bem como a invasão direta da próstata, escroto e testículos, podem ocorrer. Em fases posteriores,

ocorrem metástases a múltiplos locais, de preferência a o fígado, os pulmões e o coração, e finalmente em múltiplos locais (CHAUX et al., 2011).

A estratificação de envolvimento linfonodal é útil para determinar o prognóstico, sendo a extensão deste envolvimento decisiva para a sobrevida a longo prazo (CHAUX et al., 2011; SRINIVAS et al 1987). Com relação ao tratamento, linfadenectomia, radioterapia e quimioterapia perioperatória são opções terapêuticas para pacientes com metástases dos gânglios linfáticos (CLARK et al., 2013).

No diz respeito a diferenciação histológica, utiliza-se a classificação de Broders (quadro 1) que compreende 3 categorias: grau I - bem diferenciado, grau II/III - moderadamente diferenciado e grau IV - indiferenciado (WANICK et al., 2011; POMPEO et al., 2006).

Quadro 1 - Classificação de Grau de Broder's

GRADAÇÃO	SIGLA	CARACTERISTICA
GRAU I	G1	0 a 25% de células indiferenciadas – Bem diferenciado
GRAU II	G2	25-50% de células indiferenciadas – Moderadamente diferenciado
GRAU III	G3	50-75% de células indiferenciadas – Pouco diferenciado
GRAU IV	G4	75-100% de células indiferenciadas – Indiferenciado

(WANICK et al., 2011; POMPEO et al., 2006)

O sistema de estadiamento mais amplamente utilizado entre os clínicos é o sistema TNM mantido pelo Comitê Misto Americano contra o Cancro (AJCC) e o União Internacional para o Controlo do Cancro (UICC). Este sistema codifica a extensão do tumor primário (T), linfonodos regionais (N), e metástases distantes (M) e fornece um estadiamento baseado em T, N, e M. O TNM é atualizado periodicamente com base nos avanços em compreensão dos avanços do prognóstico do cancro para permanecer atual e relevante para a prática clínica (EDGE et al., 2010). O sistema TNM teve sua última revisão publicada em 2017 na oitava edição da *Classificação TNM de malignidade tumoral*, nele foram atualizadas todas as combinações de informações que determinam o estadiamento descrito de I a IV (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTERKIND, 2017)

Quadro 2 – Sistema de classificação TNM

T – Tamanho do tumor e grau de Infiltração	
Tx	Tumor não definido
T0	Sem evidências de tumor primário.
Tis	Carcinoma in situ
Ta	Carcinoma verrucoso não-invasivo.
T1	Tumor invadindo tecido conjuntivo sub-epitelial.
T1a	Tumor invade tecido conjuntivo subepitelial sem invasão linfovascular e não é pouco diferenciado
T1b	Tumor invade tecido conjuntivo subepitelial com invasão linfo vascular ou é pouco diferenciado
T2	Tumor invadindo corpo esponjoso com ou sem invasão da uretra.
T3	Tumor invadindo corpo cavernoso com ou sem invasão da uretra.
T4	Tumor invadindo outras estruturas adjacentes.

N – Situação dos linfonodos regionais	
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.
N1	Metástase em um único linfonodo regional superficial.
N2	Metástase em linfonodos múltiplos ou bilaterais inguinais superficiais.
N3	Metástase em linfonodos regionais inguinais profundos ou pélvicos, uni ou bilaterais.

M – Metástases	
Mx	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Presença de metástase à distância.

Fonte: (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTERKIND, 2017)

Além da classificação TNM também há o estadiamento de Jackson que classifica a doença em quatro estágios clínicos, conforme mostra o quadro 3.

Quadro 3 – Classificação de Jackson para o estadiamento do câncer de pênis

Estágio I	Tumor limitado à glândula e/ou prepúcio
Estágio II	Tumor invadindo os corpos cavernosos
Estágio III	Tumor com metástases para linfonodos inguinais
Estágio IV	Tumor invadindo estruturas adjacentes ou com linfonodos inoperáveis, ou metástases à distância

Fonte: JACKSON, 1962; POMPEO et al., 2006

Quadro 4 - Definição de estágio do câncer de pênis pela Classificação TNM.

Grupo	T	N	M
Estágio 0is	TIS	N0	M0
	TA	N0	M0
Estágio I	T1A	N0	M0
Estágio IIA	T1B	N0	M0
	T2	N0	M0
Estágio IIB	T3	N0	M0
Estágio IIIA	T1-3	N1	M0
Estágio IIIB	T1-3	N2	M0
Estágio IV	T4	QUALQUER N	M0
	QUALQUER T	N3	M0
	QUALQUER T	QUALQUER N	M1

A melhor compreensão da histologia do tumor confere uma avaliação mais precisa para o prognóstico e terapêutica da doença. O objetivo é elevar a taxa de sobrevivência, que é considerada baixa, e minimizar o impacto proporcionado pela fragilização psicológica típica, devido ao binômio câncer de pênis e mutilação (REIS et al., 2010).

Cerca de 40% dos homens são diagnosticados com câncer de pênis localizado, tendo a sobrevida dentro de 5 anos de aproximadamente 90%. No entanto, uma vez que o tumor tenha originado metástases, o prognóstico agrava-se dramaticamente. A sobrevivência global para a doença metastática é de aproximadamente 80% para o envolvimento inguinal unilateral de linfonodos ≤ 2 (fase N1 ou limitado N2), 10-20% para envolvimento de gânglios linfáticos bilaterais ou pélvicos (fase N2 ou N3) e $<10\%$ no caso de extensão extranodal (PAGLIARO, 2009).

2.2 Papilomavírus Humano (HPV)

O papilomavírus humano apresenta-se como um vírus de DNA não envelopado, disposto na forma circular em dupla cadeia e constituído de aproximadamente 8.000 pares de bases (HEBNER, LAIMINS, 2006). Pertence à família Papillomaviridae, gênero Papilomavírus, para o qual temos atualmente mais de 200 subtipos catalogados (SZYMONOWICZ, CHEN, 2020).

A maioria dos HPVs se mantem assintomáticos, e em média desaparecem em cerca de 7,5 meses, e em HPVs de alto risco uma média de 12,2 meses. Porém quando a infecção não é eliminada, a maioria se manifesta como lesões proliferativas do tecido cutâneo e epitélio da mucosa, promovendo o aparecimento de verrugas características, que no geral, são benignas e tipicamente assintomáticas, mas podem se tornar problemáticas apresentando dor, coceira e sangramento (STRATTON; CULKIN, 2016; HEBNER, LAIMINS, 2006).

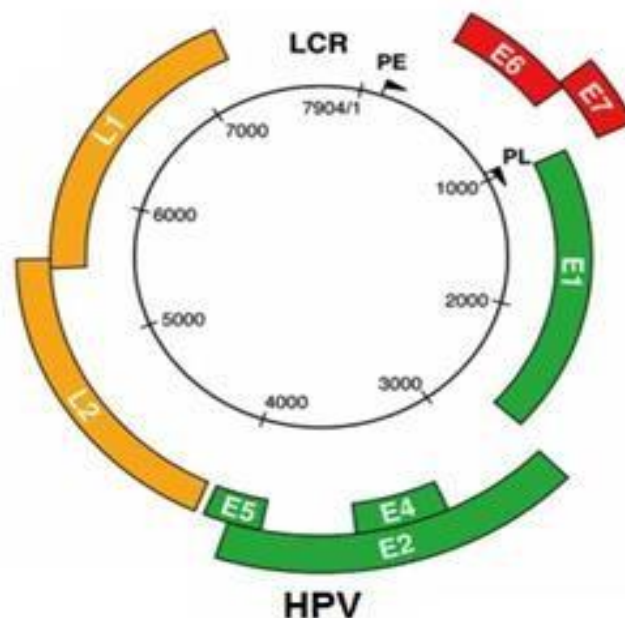
Apesar de estar envolvido historicamente no aparecimento de verrugas comuns, desde a década de 1970 a comunidade científica despertou o interesse em explorar a possível associação do HPV com diversos tipos de cânceres (HEBNER, LAIMINS, 2006). Segundo estudo de Szymonowicz, Chen (2020), acredita-se que o HPV possa ser responsável por mais de 90% dos cânceres anais e cervicais, cerca de 70% dos cânceres vaginais, vulvares e de orofaringe, e uma proporção significativa dos cânceres de pênis (SZYMONOWICZ, CHEN, 2020).

Considerando a sua associação ao câncer, os HPVs podem ser classificados em 'baixo risco' ou categorias de "alto risco" com base no potencial para indução de transformação maligna. A classificação de baixo risco que inclui os HPV 6 e 11, tipicamente causam verrugas benignas e raramente são associadas com malignidade. Em contraste, a infecção com vírus de alto risco, inclui os subtipos HPV 16, 18, 31 e 45 e tem se mostrado ligada ao desenvolvimento do carcinoma cervical, bem como

outros tumores malignos genitais e cânceres de cabeça e pescoço (HEBNER, LAIMINS, 2006).

Todos os HPV's apresentam o genoma viral envolvido por um capsídeo de formato icosaédrico com cerca de 50 a 60nm de diâmetro. O genoma é dividido em duas porções: a região reguladora (LCR - long control region), que contém a origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição e as regiões codificadoras que são denominadas ORF (open reading frames) e são divididas nas sequências precoce e tardia (ROSA et al. 2009). A região precoce (E – early) abriga os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são responsáveis pela transcrição do DNA do vírus, maturação e liberação das partículas virais, transformação e immortalização das células infectadas, auxiliando ainda na replicação e atuando na regulando da expressão de genes virais (HONG; LAIMINS, 2017). Os genes da região tardia (L – late) codificam, respectivamente, as proteínas principal e secundária do capsídeo. A região tardia L1 ORF é a mais conservada entre os HPVs. O seu produto, proteína L1, representa 80% das proteínas do capsídeo viral, constituindo a proteína mais abundante e de alta imunogenicidade. A proteína L2, com a L1, contribui para a incorporação do DNA viral dentro do vírion (LETO, 2011).

Figura 1: Composição do DNA circular do HPV e suas competências na patogênese do vírus.



Fonte: Burk; Chen; Van Doorslaer (2009).

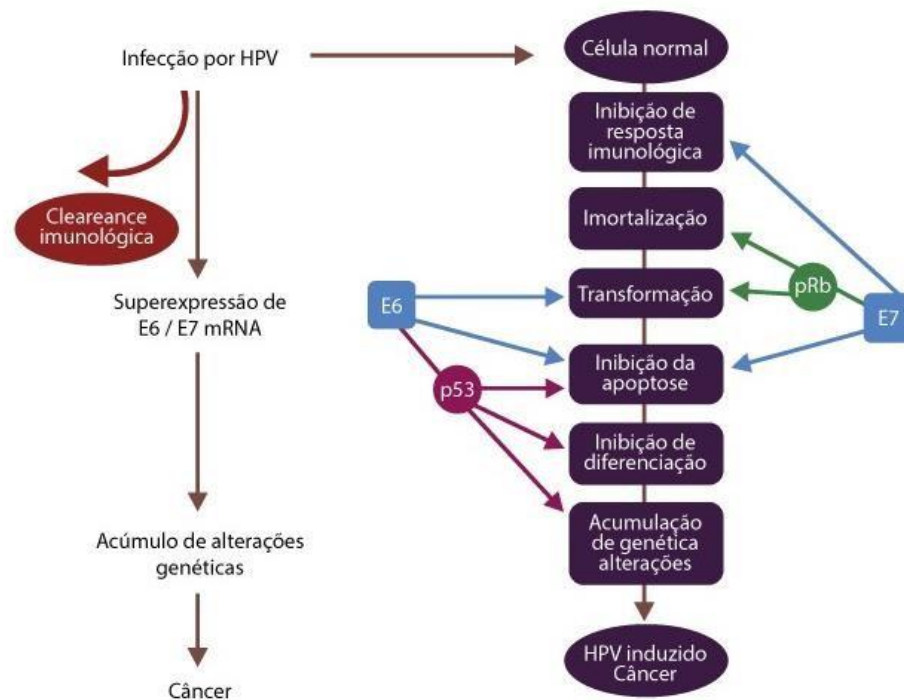
2.2.1 Fisiopatologia da infecção pelo HPV e o câncer

As proteínas pertencentes a região precoce (E – early) têm um papel importante na oncogênese viral, em que especialmente as proteínas E6 e E7 que estão associadas à integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, transformação maligna, e progressão para o câncer (BRIANTI et al. 2017). Um dos alvos importantes da proteína E6 é o fator de transcrição da proteína p53, envolvida no mecanismo de supressão tumoral.

A junção de E6 a um polipeptídico celular do hospedeiro conhecido como polipeptídeo relacionado à E6 (E6-AP), proporciona a formação de um complexo que age como uma ubiquitina-ligase, associando a ubiquitina à p53, tanto para degradar p53 como para inibir a função de proteção dela, através do bloqueio da acetilação (HONG; LAIMINS, 2017; HEBNER et al., 2007; SCHIFFMAN et al., 2007). As mutações na P53, presentes em muitos processos carcinogênicos, não foram identificadas em tumores relacionados com HPV, tais como os cânceros cervicais (SPIESS et al., 2016). Este fato nos permite afirmar que há uma intrínseca relação na presença do vírus e a degradação da p53.

Já a proteína E7 regula eventos do ciclo celular por ligação à proteína do retinoblastoma (pRb), facilitando assim as atividades dos membros da família da E2F que regulam a expressão de muitos genes da fase S (LONGWORTH et al, 2005). A libertação do fator de transcrição E2F do complexo proteico pRb-E2F, promove além da progressão do ciclo celular, bloqueio da inibição de feedback em p16Ink4a. Como consequência, a proteína p16INK4A é expressa em elevado nível e é associada com infecção por HPV de alto risco (HUBBERS; AKGUL, 2015).

Figura 2 - Modelo simplificado que ilustra as principais desregulações induzidas pelos oncogenes virais E6 e E7.



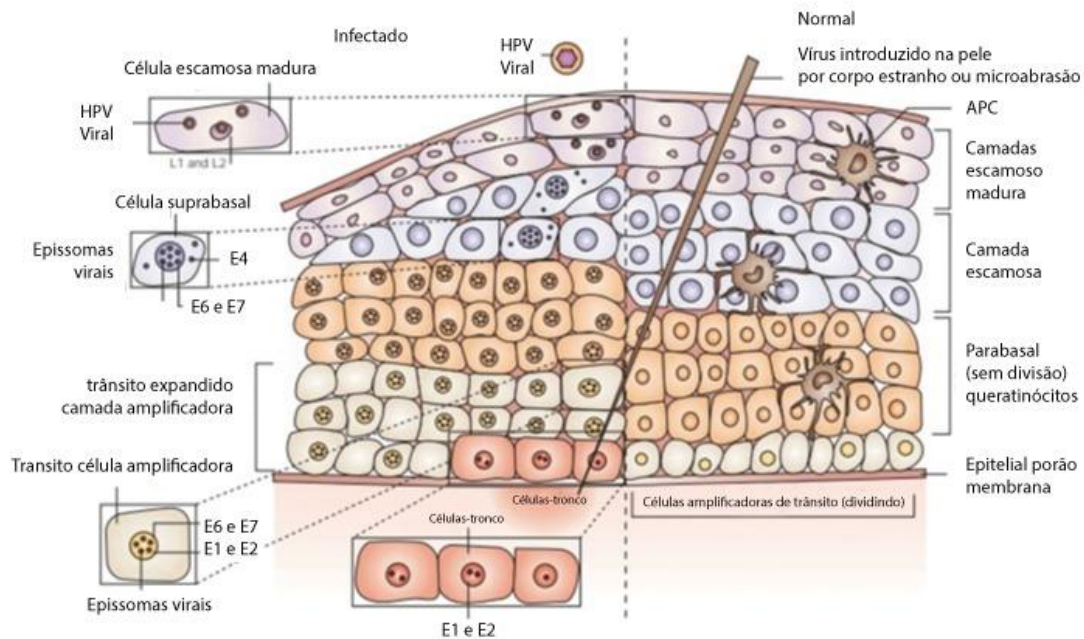
Fonte: MIRGHANI et al (2014)

Embora a interferência com os supressores tumorais p53 e Rb sejam sentidos como sendo os efeitos oncogênicos mais críticos da infecção por HPV, outras alterações podem também ser importantes. A expressão alterada dos microRNAs (miRNA) foi avaliada noutros carcinomas espinocelulares penianos resultantes da infecção por HPV e pode ser importante para a perturbação da regulação epigenética que resulta em efeitos oncogênicos. Num estudo de avaliação da expressão miRNA em amostras de cancro do pênis, a expressão miR-218 foi reduzida em amostras positivas para infecção por HPV de alto risco. Juntamente com a desregulação da p53 e Rb, a redução da expressão miR-218 pode ser um evento importante na carcinogênese induzida pelo HPV (STRATTON; CULKIN, 2016).

O epitélio escamoso atua como uma “pele” protetora para impedir patógenos de infectarem o tecido subjacente. O vírus inicia a infecção ultrapassando mecanismos de defesa inata do hospedeiro e adentrando o epitélio escamoso, atingindo a camada basal do epitélio, o que só é viável por meio de micro abrasões no epitélio estratificado, revelando a camada basal ao ambiente (HONG; LAIMINS, 2017). Em seguida o vírus libera o seu DNA, que será conduzido ao núcleo da célula do hospedeiro para dar

início ao processo de replicação viral, resultando em aproximadamente 100 cópias por célula (HONG; LAIMINS, 2017; SPIESS et al., 2016;). Este processo pode ser visualizado na figura 2:

Figura 3 - Esquema da infecção por HPV, mostrando a expressão diferencial dos diferentes genes virais nas diferentes camadas do epitélio



Fonte: Frazer, 2004

O ciclo de vida do PV é diretamente relacionado ao programa de diferenciação celular da célula hospedeira. O vírus infecta as células basais do epitélio que apresentam potencial de diferenciação. As funções vegetativas virais, síntese do DNA e proteínas do capsídeo, bem como a montagem dos novos vírus, ocorrem exclusivamente nos queratinócitos diferenciados (LETO, 2011; HAZARD et al, 2007). O epitélio escamoso sofre a ação do vírus de duas formas distintas: ou como uma infecção viral que dará origem aos condilomas e displasias ligeiras ou como uma lesão pré-cancerosa. A primeira representa infecções por HPV em grande parte transitórias, nas quais o epitélio escamoso suporta a produção de virions e produz uma lesão morfológica de baixo grau. Já nas lesões pré-cancerosas (Neoplasia intraepitelial peniana - PeINs associados ao HPV), o genoma viral integra-se no genoma do hospedeiro, e a oncogene viral e a superexpressão impulsiona a proliferação celular

para produzir uma expansão clonal de células indiferenciadas que comportam um risco de transformação maligna (SPIESS et al., 2016).

Em lesões benignas associadas ao HPV, o genoma viral encontra-se separado do DNA celular e surge como um plasmídeo extra cromossômico (corpo episomal). Nas lesões malignas, que não fazem parte da história natural do HPV, o DNA viral se integra aos cromossomos hospedeiros (OKUNADE, 2019; BURD, 2003).

Estudos utilizando a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) comprovam a presença deste vírus em 30% a 50% dos casos de câncer peniano (CUBILLA et al., 2010).

2.2.2 Classificação dos tipos de HPV

Os HPVs recebem uma classificação por gêneros, sendo eles: alfa-papilomavírus, beta-papilomavírus, gama-papilomavírus, mupa-papilomavírus e nupa-papilomavírus (BANSAL; SINGH; RAI, 2016). Os papilomavírus são também descritos por tipos, com diferente propensão das células infectadas à modificação maligna. Assim, os tipos são classificados em alto risco (ex. 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82) e baixo risco (ex. 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72 e 81) (HUBBERS; AKGUL, 2015). Esta classificação leva em consideração as sequências nucleotídicas do Codificação ORF para a proteína L1 do capsídeo maior (GALATI et al, 2020)

O gênero Alfa-papilomavírus inclui os HPVs com tropismo para epitélio genital, mas alguns tipos pertencentes a este gênero causam verrugas vulgares. Engloba os tipos de HPVs de alto risco para câncer de colo de útero, como os HPVs 16 e 18, alocados, respectivamente, nas espécies 9 e 7 deste gênero, e tipos de baixo risco, como os HPVs 6 e 11, ambos na espécie 10. Dentre os HPV's classificados como Beta-papilomavírus temos cinco diferentes espécies. Os HPVs 5 e 8, pertencentes à espécie 1 deste gênero, são os tipos mais comumente identificados na pele de indivíduos com epidermodisplasia verruciforme (EV). Neste gênero também se encontram HPVs cutâneos detectados na pele da população geral sem lesões, demonstrando a ubiquidade e a alta ocorrência de infecções não sintomáticas. No grupo do Gama-papilomavírus temos cinco espécies diferentes com sete tipos que provocam lesões cutâneas: HPVs 4, 48, 50, 60, 88, 65, 95. O gênero Mupapilomavírus contém os HPVs 1 e 63, sendo o HPV1 o mais estudado e causador verrugas vulgares e palmares. No grupo dos Nupapilomavírus engloba apenas uma espécie, o HPV 41 (LETO, 2011).

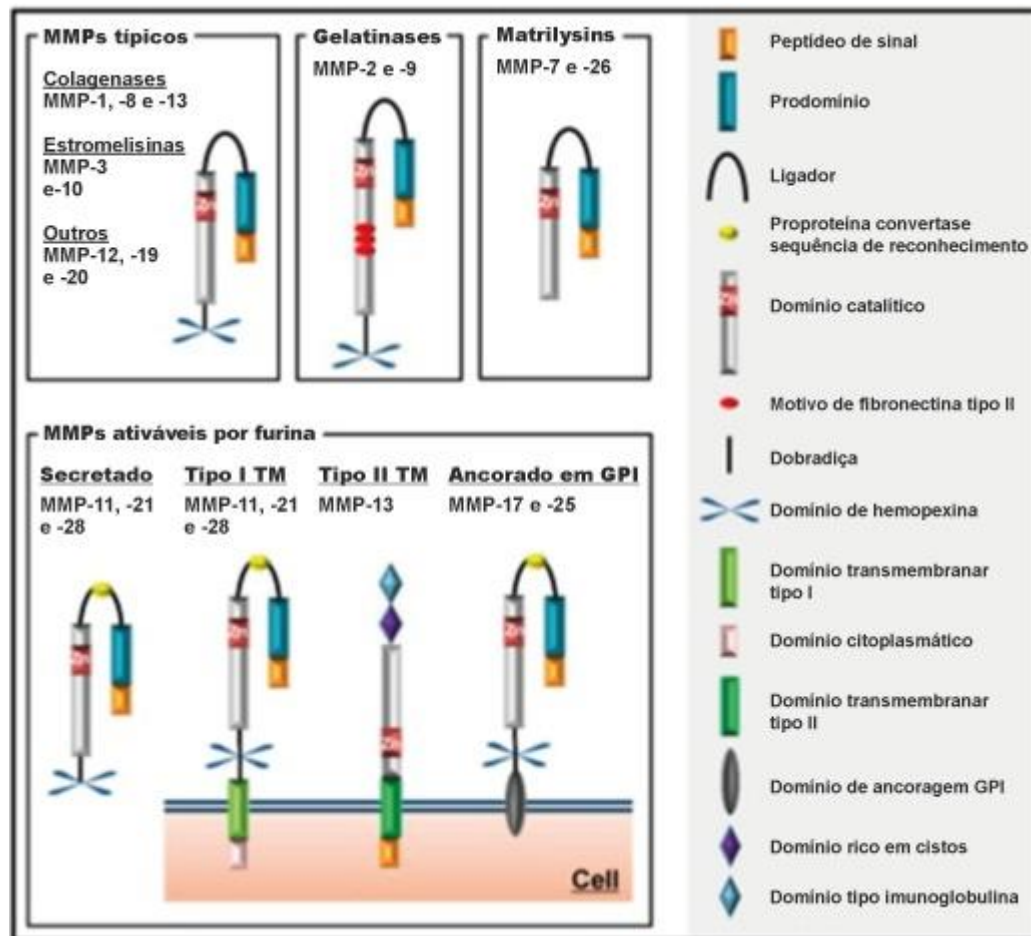
Com base nas características relacionadas ao tropismo tecidual e local de isolamento do vírus, os HPV's são ainda classificados em três grupos: cutâneos, mucosos e associados a EV.

2.3 Metaloproteinases da matriz extracelular

A matriz extracelular (ECM) desempenha um papel em adesão, crescimento, apoptose e comunicação célula-célula, e a regulação destas funções são críticas para as atividades celulares. Há uma família de proteínas que funciona na regulação da MEC: é a das metaloproteinases de matriz (MMPs; também chamadas matrixins) (JACKSON et al., 2010). Estas constituem uma família de proteases dependentes do zinco e do cálcio extracelulares que se clivam dentro de um polipeptídeo (endopeptídeos), com atividade enzimática contra quase todos os componentes proteicos da matriz extracelular (GONZALEZ-AVILA et al., 2019).

Vinte e oito MMPs foram identificados em vertebrados, dos quais 24 estão presentes em humanos. Estes incluem duas formas equivalentes de MMP-23 (MMP23A e MMP-23B) codificadas por 2 genes distintos no cromossoma 1 (GONZALEZAVILA et al., 2019). As MMPs são numeradas sequencialmente de MMP-1 a MMP-28 (JACKSON et al., 2010, CUI et al., 2017, MITTAL et al., 2016) e contêm diferentes domínios cujas estruturas moleculares foram previamente descritas (SOMERVILLE et al., 2003). Estes são basicamente formados por: 1- um peptídeo de sinal que direciona as MMPs para vias secretor exceto para MMPs do tipo membrana (MT-MMPs), 2- um pró-peptídeo N-terminal, 3- um sítio catalítico que inclui um átomo de zinco, 4- um domínio de dobradiça ou ligante rico em resíduos de prolina e 5- uma região semelhante à hemopexina C-terminal que confere a especificidade do substrato ou ligante, a localização e a regulação da atividade enzimática das MMPs (AMĂLINEI et al., 2010). A estrutura das metaloproteinases esta ilustrada na figura 4.

Figura 4: Esquema estrutural das diversas famílias de metaloproteínases da matriz



Fonte: Tokito; Jougasaki, 2016 (ADAPTADO)

As metaloproteínases da matriz estão envolvidas na ativação e libertação de diferentes quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, fatores de adesão molecular, e proteínas citoesqueléticas que lhes permitem participar de eventos fisiológicos, como por exemplo inflamação, embriogênese, cicatrização de feridas, angiogênese e remodelação óssea (LOFFEK et al., 2011).

As alterações na expressão e atividade das MMPs ocorrem em processos biológicos normais por exemplo, durante a gravidez e a cicatrização de feridas, mas também foram observadas em cardiovasculares doenças como a aterosclerose, aneurismas e varizes, distúrbios músculo-esqueléticos como a osteoartrose e a reabsorção óssea, e em vários cânceros. As MMPs também têm sido implicado na progressão e invasividade de tumores (CUI et al., 2017).

O conhecimento sobre o papel das metaloproteínases, tanto em eventos fisiológicos quanto patológicos, ganhou impulso e avançou a partir dos estudos

genéticos envolvendo estas. O mapeamento de genes possibilitou a identificação de todas as MMPs, e as possíveis alterações genéticas relacionadas a expressão individual delas. Assim, os genes têm proporcionado novas perspectivas sobre as suas funções (SOMERVILLE et al., 2003).

Tradicionalmente, as MMPs têm sido subdivididos em collagenases, gelatinases, estromelisinases, e MMPs do tipo membranas, de acordo com a sua especificidade de substrato, estrutura primária e localização celular. No entanto, descobertas mais recentes mostram que várias enzimas desta família não cabem facilmente nestas classificações e alternativas baseadas no domínio estrutura, mecanismo de ativação e localização celular foram sugeridos (CLARK et al., 2008).

2.3.1 Regulação das MMPs

Por conta do seu potencial de destruição de tecidos, as MMPs são rigorosamente reguladas em vários níveis. Existem as seguintes formas para regular a atividade das MMPs: 1) regulação da transcrição do gene; 2) ativação da pró-enzima através da remoção do domínio pro-peptídeo; 3) a interação com inibidor de metaloproteinases (TIMPs); 4) compartimentação pericelular ou intracelular; 5) ativação alostérica; 6) modificação oxidativa de cátions. A regulação da expressão gênica é influenciada por agentes químicos, stress físico, produtos oncogênicos e fatores de crescimento, citocinas e interações células-células ou células-MEC. Os hormônios glicocorticoides, o ácido retinóico e o fator de crescimento transformador β 1 (TGF β 1) também interferem na expressão de algumas MMPs (KIM; JOH, 2012). Em relação à regulação da expressão genética, Yan e Boyd (2007) classificaram os genes codificadores de MMP em três grupos: o primeiro grupo inclui genes cujos promotores têm sítios de ligação da proteína-1 (AP-1) e uma caixa TATA, e inclui MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-19 e MMP-26. A regulação destes promotores envolve frequentemente o intensificador de poliovírus proteína-3 (PEA-3), bem como as citocinas e os fatores de crescimento. O segundo grupo inclui regiões promotoras de genes contendo apenas uma caixa TATA e inclui MMP-8, MMP-11 e MMP-21. A sua regulação da expressão genética é mais flexível quando comparada com o grupo 1, tal como anteriormente revisto (CLARK et al., 2008). O terceiro grupo apresenta múltiplas ilhas GC que se ligam a fatores de transcrição de proteína-1 (Sp1) e Sp3 e incluem MMP-2, MMP-14 e MMP-28. Os genes promotores deste grupo não dispõem de uma caixa TATA (GONZALEZ-AVILA et al, 2019).

Os MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificadores que regulam a expressão genética pós-transcrição (por exemplo, ligando-os aos mRNAs e visando a sua degradação) e estão criticamente envolvidos em processos fisiológicos e patológicos como o câncer (KROL et al., 2010; RUPAIMOOLE & SLACK, 2017; SANTOS et al., 2018; 2020). A regulação alterada dos miRNAs é capaz de interferir com a expressão do MMP, inclusive no contexto do cancro. Um exemplo foi fornecido por Li et al., (2015) que observaram que uma diminuição nos níveis de miR-129 levou a um aumento da expressão de MMP-9 nos tecidos do cancro do pulmão, promovendo uma forma mais agressiva da doença. Wang et al. (2015) também relataram que uma diminuição da expressão de miR-29b correlacionada com o aumento dos níveis de MMP-2 nos tecidos de cancro do pulmão e com a presença de metástases nos gânglios linfáticos. Em contrapartida, Xu et al (2015a) observaram que a expressão aumentada do microRNA-20a, eleva os níveis de MMP-2 e MMP-9 por meio da regulação da expressão do inibidor de tecido da proteína metaloproteinase-2 (TIMP-2), favorecendo assim a transição epitelial para mesenquimal no cancro colorretal.

A compartimentação celular é outra forma de regular as MMPs, através da qual estas estão confinadas a compartimentos celulares específicos onde participam no metabolismo de uma grande variedade de componentes intracelulares. A localização das MMPs está diretamente ligada a sequências de peptídeos de sinal que podem, por exemplo, impedir a sua translocação através do retículo endoplasmático (Hegde e Bernstein, 2006) (CAUWE; OPDENAKKER, 2010).

A regulação das metaloproteinases também acontece por ativação da próenzima através da remoção do domínio pro-peptídeo. As pró-enzimas em MMP's estão inativas (exceto para MMP-23) porque o seu domínio pro-peptídeo tem cerca de oitenta aminoácidos que, ao formar uma estrutura com uma esfera de 40 Å, impedem a ligação de um substrato (TALLANT et al., 2010), a sua ativação ocorre através da mudança conformacional do pro-peptídeo (LOFFEK et al., 2011).

Pesquisas realizadas por Loffek et al., (2011), Kim e Joh, (2012) e Tallant et al., (2010) revelaram como as MMP's são ativadas quando o seu pro-peptídeo é removido autocataliticamente, obtendo-se uma atividade enzimática completa.

As MMP's ativas devem ter a sua atividade enzimática rigorosamente regulada a fim de que a homeostase dos tecidos seja preservada. Temos dois grupos de inibidores endógenos que atuam neste controle: α 2- macroglobulina (α 2M) e inibidores de tecido de metaloproteinase (TIMPs) (NAGASE et al., 1994). Enquanto α 2M é o

principal inibidor de protease em fluidos corporais, os TIMPs são reguladores específicos da atividade enzimática das MMP's nos tecidos (LAMBERT et al., 2004). Os TIMP's são capazes de regular a proliferação celular, apoptose, angiogênese, tumorigênese e metástase. A promoção ou inibição destes processos é altamente dependente do contexto, variando com o tipo celular, a molécula de TIMP e a sua concentração. Curiosamente, os TIMP's têm uma variedade de papéis biológicos que parecem ser independentes do seu papel inibidor de enzimas (STETLERSTEVENSON, 2008).

2.3.2 MMP's e o câncer

A agressividade do câncer provém da invasão de tecidos locais e progressão para locais distantes. Um acontecimento crítico durante a progressão do câncer é o crescimento invasivo de células neoplásicas nos tecidos hospedeiros: isto envolve uma série de interações complexas que ocorrem na interface tumor-hospedeiro, incluindo a angiogênese e uma extensa remodelação da matriz extracelular (MEC) (QUARATA et al., 2007).

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos capilares, que ocorre numa variedade de condições patológicas ou não, tais como no crescimento embrionário, na cura de uma ferida, no crescimento tumoral e metástase (PLATE et al., 1994). Este processo compreende várias etapas, incluindo a secreção de protease e proteólise de matriz extracelular, proliferação de células endoteliais e migração para formar rebentos capilares e fechamento do lúmen.

Um tumor é visto como um complexo ecossistema em evolução. Uma característica de todos os ecossistemas é que pequenas alterações em um dos componentes podem causar uma reorganização dramática de todo o sistema. Como consequência, o estroma tumoral tem uma forte influência em muitas etapas do desenvolvimento tumoral e progressão (NOËL; JOST, 2008). Na homeostase normal dos tecidos, a rede interativa de proteases e os seus inibidores naturais mantêm um equilíbrio proteolítico. Durante a progressão do câncer, este equilíbrio é perturbado pela superexpressão de proteases, incluindo as metaloproteinases de matriz (MMPs). Este desequilíbrio altera o compartimento não celular que, por sua vez, ativa efetores moleculares que conduzem ao estabelecimento de um meio permissivo para a progressão, invasão e disseminação de tumores (NOËL; JOST, 2008).

As MMP's não promovem a progressão de tumores apenas através da degradação da MEC, como originalmente se pensava, mas também através da

clivagem das moléculas de sinalização, tais como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, moléculas de aderência e receptores. Isto resulta na ativação e inativação de muitas vias de sinalização, resultando tanto em alterações das atividades celulares como as alterações na expressão genética. Como resultado, o crescimento do estroma e as respostas de defesa imunitária acabam por falhar, resultando em evasão imuno-célula, evolução das metástases, resistência dos quimioterápicos e maior disseminação de tumores. Em contrapartida, já foi reconhecido o papel protetor das MMP's em algumas etapas da carcinogênese, por isso o bloqueio inespecífico da função delas não seria uma estratégia viável a se pensar para o tratamento do câncer (OVERALL; KLEIFELD, 2006).

Expressão excessiva de várias MMPs (MMP2, MMP3, MMP9, MMP13, MT1MMP) têm sido associados à transição epitelial para mesenquimal (EMT), um processo biológico fundamental onde as células epiteliais perdem a sua polaridade, a adesão de células e adoptar uma morfologia mesenquimal adequada à migração. Além disso, tanto o MMP1 como o MMP7 contribuem para EMT por degradação da Ecadherina, uma molécula de adesão de células epiteliais (NOËL; JOST, 2008).

Existem diversos estudos correlacionando o aumento específico das metaloproteinases em diversos tipos de tumor. GONZALEZ-AVILA et al. (2019) estabeleceram associações claras entre o aumento dos níveis de um ou mais MMPs nos fluidos corporais, amostras de tecidos e progressão do cancro. O Quadro 5 fornece exemplos de MMPs que são sobre expressas em várias neoplasias malignas.

Quadro 5 – Envolvimento das metaloproteinases nos diversos tipos de câncer e respectiva alteração celular promovida.

MMP's	Tipo de Tumor	Alteração celular	Referências
MMP-2 e MMP-9	Câncer de mama	Invasão angiogênese	Bharti et al 2018
MMP-2 e MMP-9	Câncer de pulmão	Angiogênese	Chao et al 2019
MMP-9	Câncer de pâncreas	Invasão	Grunwald et al 2016
MMP-1	Câncer de pâncreas	Migração	Huang et al 2018
MMP-2 e MMP-9	Câncer de ovário	Invasão	Lu et al 2017
MMP-9	Câncer de bexiga	Invasão	Qin et al 2018
MMP-13	Nasofaringe	Migração e invasão	Shan et al 2018
MMP-2 e MMP-9	Câncer de pulmão	Migração e invasão	Wang et al 2017

MMP-2 e MMP-9	Câncer gástrico	Metástases	Wang et al 2019
MMP-7	Câncer de próstata	Invasão	Xie et al 2016
MMP-2 e MMP-9	Câncer de mama	Proliferação, invasão e metástase	Sun et al 2019
MMP-2 e MMP-9	Melanoma	Proliferação, invasão e migração	Yao et al 2019
MMP-9	Células estaminais cancerígenas	Migração e invasão	Long et al 2012

As pesquisas realizadas com MMP's no câncer mostram que a expressão aumentada destas pode funcionar como marcadores de diagnóstico e prognóstico precisos (GONZALEZ-AVILA et al, 2019).

2.3.3 HPV e a regulação da expressão e atividade das MMP's

Os cânceres induzidos por HPV surgem de lesões intra-epiteliais precursoras (por exemplo, neoplasias intra-epiteliais cervicais, NIC's, e neoplasias intra-epiteliais penianas, PeIN) (STEENBERGEN et al 2014). Para progredir da neoplasia intraepitelial para a neoplasia invasiva cancro, as células neoplásicas devem adquirir propriedades de capazes de penetrar na membrana basal (BM) e degradando a matriz extracelular subjacente (ECM), composto por vários componentes estruturais, por exemplo, colágeno, elastina e fibronectina (BRANCA et al, 2006). O desenvolvimento do câncer invasivo a partir de lesões intra-epiteliais depende da expressão e distribuição alterada de MMP's (STEENBERGEN et al 2014).

As células neoplásicas sintetizam as MMP's após a ativação de oncogenes, inativação de proteínas onco-supressoras, estimulação por fatores de crescimento ou mediadores inflamatórios, geração de espécies reativas de oxigénio e/ou a presença de hipoxia (HANZAWA et al 2000; JACOB-FERREIRA et al 2013; TANG et al 2015; SHIN et al 2015; ZONG et al 2016).

Diversos estudos investigaram a relação entre a progressão e invasão do câncer HPV induzido e a expressão aumentada das metaloproteinases da matriz. Davidson et al. (1999) descreveram a expressão da MMP-9 no carcinoma espinocelular cervical e em amostras NIC 2-3 e observaram que a expressão era elevada quando comparada com amostras normais. Zhou et al. (2002) analisaram a presença de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 no colo do útero normal, amostras de NIC cervical e amostras de câncer do colo do útero utilizando um ensaio de imuno-histoquímica (IHC) e

observaram a sobreexpressão destes componentes da MEC que podem desempenhar um papel fundamental na invasão dos gânglios linfáticos associados ao cancro do colo do útero e à metástase.

Cardeal et al (2012) mostraram que a expressão HPV16 - E7 está associada a uma diminuição da expressão e função do TIMP-2 nos queratinócitos primários. Verificamos que o HPV16 está associado a uma maior expressão de MMP's específicos (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14 (MT1-MMP) e MMP-15) durante a progressão do câncer do colo do útero quando comparado com tecido normal (CARDEAL et al 2012; DISCACCIATI et al 2015; DA SILVA et al 2006; KAEWPRAG et al 2013).

Zhu et al (2015) demonstram que as oncoproteínas de alto risco do HPV-16 (E6 e E7) promoveram a expressão das MMP-2 e 9 contribuindo para a migração de células cervicais. Kuasne et al (2017) descobriram que a expressão da MMP-1 é um marcador preditivo de metástase em gânglios linfáticos no cancro do pênis através das vias PPARG, VEGF e EGFR.

A investigação de Smola-Hess et al (2005) observou que os queratinócitos que exprimem E7 de tipos de HPV cutâneos e mucosos de alto risco exibem uma expressão regulada positivamente de MT1-MMP.

Kaewprag et al. (2013) analisaram a capacidade das oncoproteínas HPV16 e HPV18 para regular a expressão das oncoproteínas MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11 e MMP-14 (MT1-MMP)

Portanto, as MMPs podem ser utilizadas como um possível marcador precoce da progressão de diversos cancres induzidos pelo HPV.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a expressão de metaloproteinases (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) no desenvolvimento do câncer de pênis HPV+ e HPV- através de estudos morfológicos e moleculares.

3.2. Específicos

- ✓ Caracterizar as amostras de câncer de pênis do Banco de Tumores do Maranhão, tendo em conta variáveis clínico-patológicas e epidemiológicas.

- ✓ Estudar a presença de HPV nas amostras de doentes com câncer de pênis, por técnicas de PCR.
- ✓ Determinar os tipos de HPV presentes nas amostras dos pacientes com câncer de pênis através do sequenciamento de DNA.
- ✓ Avaliar a expressão das metaloproteinases 2 e 9 em amostras de pacientes com câncer de pênis por técnicas de PCR.
- ✓ Estudar a expressão de TIMPs 1, 2 e 3 em amostras de câncer de pênis por técnicas de PCR quantitativo.
- ✓ Correlacionar a expressão das MMPs e TIMPs e a presença ou ausência de HPV e os seus diversos tipos
- ✓ Correlacionar a expressão das MMPs e TIMPs com as variáveis clínicopatológicas dos pacientes com câncer de pênis.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo e Local de estudo

Trata-se de um estudo quantitativo com recorte transversal em que foram descritas as variáveis clínico-patológicas e epidemiológicas de pacientes com câncer de pênis, bem como foi estudado, por técnicas de PCR quantitativo, o envolvimento das metaloproteinases 2 e 9 e dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) 1, 3 e 4 no câncer peniano.

A pesquisa foi realizada no laboratório multiusuário com as amostras armazenadas pelo Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). Foi realizada também a análise dos prontuários dos pacientes vinculados as amostras nos hospitais referência em Oncologia no Estado do Maranhão, Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo (IMOAB), Hospital Geral Tarquínio Lopes Filho e Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HU-UFMA).

4.2 Critérios de inclusão/exclusão

Foram incluídas nesta pesquisa todas as amostras biológicas de pacientes com câncer de pênis, que fizeram opção em conceder para utilização em pesquisas futuras sem novo contato; mas apenas condicionado à aprovação pelas instâncias éticas.

Foram excluídas as amostras que após análise histológica foram identificadas como tecido proveniente do colón.

4.4 Coleta de dados

Os dados relacionados à investigação foram obtidos através do questionário sociodemográfico (Anexo A) obtido dos arquivos do Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão. Os questionários eram respondidos por pacientes ou seus acompanhantes no dia anterior à cirurgia ou no dia da mesma.

Os dados clínicos e patológicos do paciente e do tumor (regiões acometidas, estadiamento clínico, tipo histológico, presença ou ausência de comprometimento linfonodal e evolução clínica) foram obtidas diretamente do prontuário médico dos pacientes.

4.5 Coleta e processamento das amostras

O método de amostragem foi por conveniência. Foram coletadas amostras de 75 pacientes e para a variável relacionada a detecção de HPV, foram somadas a estas outras 45 amostras que já tinham resultado procedentes do biorepositório da professora Flávia Vidal. As 75 amostras utilizadas nesta pesquisa estavam armazenadas no Banco de Tumores e DNA do Maranhão e foram coletadas nos hospitais de referência em Oncologia no Maranhão. O mapa de cirurgia dos hospitais era fornecido um dia antes da cirurgia para o BTMA. Antes de realizar o procedimento, a equipe convidava o paciente a participar da pesquisa e somente após assinar o termo de consentimento livre esclarecido TCLE (Anexo B) e responder o questionário (Anexo A), que ele era encaminhado para a sala de operação. Foram coletadas amostras de tumor e tecido adjacente durante a cirurgia desses pacientes.

Um fragmento de tecido tumoral foi acondicionado em meio optimum cutting temperature (OCT) e imediatamente congelada a -80°C, outro foi acondicionado em formol para estudos de histologia e imunohistoquímica, um fragmento foi armazenado em RNA Later (Life Technologies) primeiramente a -20°C e após 24h retirado o RNA Later a amostra foi armazenada a -80°C até seu uso. O mesmo procedimento ocorreu para amostras de tecido adjacente a lesão- livres de tumor.

4.5.1 Extração e quantificação do DNA viral

A extração do DNA foi realizada para que posteriormente fosse feito o PCR para detecção de HPV nas amostras.

O princípio do teste é o isolamento de DNA a partir de amostras de tecido fresco. O procedimento foi realizado conforme está descrito pelo manual de uso da Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen). O DNA extraído foi quantificado através do espectrofotômetro Nanovue (GE® USA). A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280nm, para a detecção de uma eventual contaminação da amostra por proteínas. Quando a relação entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm estava entre 1,6 e 1,9 o material foi considerado puro.

- Procedimentos Iniciais:

Ao abrir o kit, foi adicionado 96-100% etanol aos tampões PureLink Genomic Wash Buffer 1 and Purelink Genomic Wash Buffer 2 de acordo com as instruções do fabricante. Depois homogeneizou-se e foi ligado o termo-mixer a 55°C. Após, as amostras de tecido fresco foram pesadas na balança analítica (uso máximo de 25mg de tecido).

- Extração:

O tecido pesado foi colocado em um tubo de 2,0 mL, depois foi adicionado 180 uL do PureLink Genomic Digestion Buffer e 20 uL de Proteinase K. As amostras foram incubadas a 55°C (banho seco) até que a lise estivesse completa (1h - overnight). Vortexado algumas vezes. Após 1h de digestão foi utilizado homogeneizador de tecidos para facilitar a digestão. Depois, o lisado foi centrifugado em velocidade máxima por 3 minutos a temperatura ambiente para retirar debris. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 20 uL de RNase ao lisado, depois vortexado e foi deixado incubando a temperatura ambiente por 2 minutos. Adicionouse 200 uL do PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer e vortexou-se. Foi adicionado 200 uL de etanol 96-100% ao lisado e vortexado por 5 minutos. O lisado foi adicionado à coluna PureLink Spin Column. O material foi centrifugado a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente. O tubo coletor utilizado é descartado com o filtrado e foi colocada a coluna em um novo tubo coletor. Depois foi adicionado 500 uL de Wash Buffer 1 à coluna. Após isso, é centrifugada a temperatura ambiente a 10000 x g por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado com o filtrado e colada a coluna em um novo tubo coletor. Foi adicionado 500 uL de Wash Buffer 2 à coluna. Centrifugado em

velocidade máxima por 3 minutos a temperatura ambiente. Descartado o tubo coletor com o filtrado. Depois foi colocada a coluna spin em um tubo de 1,5 estéril e adicionado 50-100 uL de PureLink genomic Elution Buffer à coluna. Incubado a temperatura ambiente por 1 minuto. A coluna foi centrifugada em velocidade máxima por 1 minuto. O tubo contém ao final DNA eluído, a coluna foi removida e descartada. O DNA purificado foi armazenado a -20°C.

4.5.2 PCR Nested

O DNA do HPV foi identificado através da técnica de amplificação PCR Nested utilizando o termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Califórnia, USA). Os primers utilizados foram os PGMY 09 e PGMY11 amplificando sequências de 450pb da região L1 do DNA viral no primeiro round e os primers GP+5 e GP+6 no segundo round que amplificam as sequências de 190pb da região L1 do DNA do vírus (VIDAL et al., 2012).

Para realização do PCR Nested foi primeiro pré-aquecido o tampão 5x SSIV Buffer para temperatura ambiente antes de ser utilizado. Para a preparação dos primers PGMY 09 e PGMY 11 foram utilizados os reagentes que vem em cada kit de primer. No PGMY 09 foram utilizados 13 reagentes, 2 uL de cada reagente, totalizando 26 uL e adicionado 74 uL de água pura. Para o PGMY 11 foram utilizados 5 reagentes, 2 uL de cada, totalizando 10 uL e adicionados 90 uL. Ao final, os dois primers continham 100 uL.

4.5.3 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão de borato-EDTA 1X. Uma alíquota de 5µL de DNA foi homogeneizada em uma solução de tampão de carregamento (Sigma-Aldrich, USA) e corante 0,1% de Gel Red sendo toda a mistura aplicada no gel. A eletroforese foi realizada por 30 minutos a 5 V/cm² em cuba horizontal (Life Technologies, EUA). Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em um transiluminador de luz ultravioleta (BIO-RAD Laboratories, EUA).

4.5.4 Purificação dos produtos de PCR

Para controle positivo foi utilizada uma amostra que sabidamente tinha HPV e para controle negativo um tubo sem amostra. A amostra para reação consistiu em um volume final de 25 µl contendo, dessa eram 5 uL da amostra de DNA adicionados 20 uL de uma mistura contendo 2,5µl de tampão 10X, 0,4 uL de cada primer, 0,5µl de cloreto de magnésio a 50 Mm, 0,2 uL de Dntp 10 Mm, 0,2 µl de Taq Polimerase Platinum (Invitrogen) e 15,8 uL de H₂O ultra pura (Coutlée et al., 2002).

Para o PGMY09, a reação durou aproximadamente 2 horas no termociclador em 40 ciclos no termociclador Biocycler (MJ Research,USA). Para a reação dos primers PGMY09 a desnaturação inicial ocorre por 2 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de desnaturação por 40 segundos a 95°C, 40 segundos de anelamento a 55°C, 40 segundos de extensão a 72°C. O segundo round foi utilizado PGMY11 no termociclador overnight.

4.5.5 Genotipagem pelo método de Anyplex

Para genotipagem dos subtipos virais foi realizado o sequenciamento pelo método Anyplex II (seegene). As amostras foram enviadas ao Serviço de Virologia do Instituto Português de oncologia do Porto e a genotipagem foi realizada lá.

4.5.6 PCR quantitativo em tempo real

Foi realizada PCR em tempo real para a identificação das metaloproteinases 2 e 9 e para os TIMPs 1, 2 e 3, em todas as amostras que tinham resultado da genotipagem do HPV. Exluímos desta etapa as amostras que não tiveram a genotipagem realizada por falta de DNA viral suficiente na amostra enviada para o Serviço de Virologia do instituto de Oncologia do Porto.

4.5.7 Isolamento de RNA e preparação do cDNA

Inicialmente foi realizada a Extração de RNA e a posterior conversão em cDNA. Para isolameto da molécula de Ácido Ribonucleico foi utilizado o Rneasy Plus

Micro kit (Invitrogen). Para a reação de transcriptase reversa foi utilizado kit SuperScript® IV First-Strand Synthesis System da Thermo Fischer Scientific.

4.5.8 PCR quantitativa

Para a Reação de Cadeia de Polimerase em tempo real utilizou-se o Kit Power SYBR Green Master Mix da Thermo Fisher Scientific®, seguindo o seguinte protocolo:

1) Inicialmente, para a reação de cadeia de polimerase, preparou-se o mix Power Syber Green, ao combinar-se, nessa ordem, 6 µl de Power Syber Green, 0,4 µl do primer F, 0,4 µl do primer R e 4,5 µl de água ultrapura para cada gene alvo;

2) Após essa etapa, homogeneizou-se e distribuiu-se 11 µl do mix em cada poço da placa, de acordo com o número de reações;

3) Em seguida, acrescentou-se 1 µl de Ácido Desoxirribonucleico Complementar das amostras em cada poço da placa, após esse processo, vedou-se a placa. Em ocasiões em que houve formação de bolhas na placa, utilizou-se o spin. Após preparação prévia, colocou-se a placa no aparelho StepOne e iniciou-se a reação;

Utilizou-se a seguinte ciclagem: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C a 5 segundos, 54°C a 10 segundos, 95° a 15 segundos, 60° a 1 minuto e 95°C a 15° segundos.

A Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real foi realizada no Sistema de Detecção de Sequência StepOne para os seguintes primers:

TIMP 1

SENSE TTCCGACCTCGTCATCAGGG
ANTISENSE ATTCAGGCTATCTGGGACCGA

TIMP 2

SENSE TGGAAACGACATTTATGGCAACC
ANTISENSE ACAGGAGCCGTCACCTTCTTTGAT

TIMP 3

SENSE CTGACAGGTCGCGTCTATGA
ANTISENSE GCGTAGTGTTTGGACTGGT

MMP 2

SENSE AAGGCCAAGTGGTCCGTGTGAA
ANTISENSE AACAGTGGACATGGCGGTCTCAG

MMP 9

SENSE	GGCGCTCATGTACCCTATGT
ANTISENSE	TCAAAGACCGAGTCCAGCTT

GAPDH

SENSE	AGCCACATCGCTCAGACAC
ANTISENSE	GCCCAATACGACCAAATCC

4.6 Análise, processamento de dados e testes estatísticos

Os dados coletados foram armazenados em um banco de dados no programa Excel e para sumarização de variáveis individuais e retirada de indeterminadas e sem resposta foi utilizado o programa estatístico GraphPad prisma 9.2.0 (332). A análise estatística para variáveis categóricas consistiu em testes de associação utilizando-se o Teste do Qui-Quadrado, seguido do teste exato de Fisher. Os dados de expressão gênica foram expressos sob a forma de $2^{-\Delta\Delta CT}$ e comparados entre grupos usando o teste de Mann-Whitney. Os valores estimados para níveis de significância foram comparados ao valor padrão de 0,05 para o nível de significância.

4.7 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do HUUFMA sob parecer de número: 4.790.696 de acordo com as normas para pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução CNS nº466/12).

A identificação dos participantes foi sigilosa, e os dados armazenados com o pesquisador responsável pelo estudo. Quando houve concordância de participação, os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Informado, elaborado de acordo com as normas da Resolução no 196/ 1996, do Conselho Nacional de Saúde, sendo fornecida uma cópia a cada participante do estudo. Quaisquer dúvidas surgidas ao longo do estudo foram esclarecidas pelo pesquisador responsável.

5. RESULTADOS

5.1 Análise das variáveis clínico-patológicas

Foram analisados os dados de 75 pacientes que realizaram penectomia parcial ou total. A tabela 2 mostra a análise do perfil sociodemográfico destes pacientes. Importante esclarecer que alguns pacientes preferiram não responder algumas perguntas do questionário, o que resultou em um N diferente para cada variável analisada. Quando questionados sobre a raça, foi observado que o maior quantitativo de homens se considera pardo (62,67%, n= 75), sendo a grande maioria procedente do interior do estado do Maranhão (64,76%, n=71). A análise da variável escolaridade nos mostrou que 30,56% dos pacientes tinham ensino fundamental incompleto e 26,30% era analfabeto (n=72). Sobre o estado civil, 44,44% dos pacientes eram casados (n=72). A média de idade dos pacientes ao diagnóstico foi de aproximadamente 63 anos, sendo a menor idade registrada de 23 anos e a maior de 97. Em relação a renda, a grande maioria dos pacientes (76,12%, n=67) recebiam 1 salário-mínimo ou menos.

TABELA 2: – Perfil sociodemográfico dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão.

VARIÁVEL	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA
RAÇA	75	100,00%
BRANCA	14	18,67%
PARDA	47	62,67%
PRETO	14	18,67%
PROCEDÊNCIA	71	100%
INTERIOR DO MA	46	64,79%
OUTRO ESTADO	4	5,63%
CAPITAL DO MA	21	29,58%
ESCOLARIDADE	72	100%
ANALFABETO	19	26,39%
ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO	19	26,39%
ENSINO FUNDAMENTAL INCOMPLETO	22	30,56%
ENSINO MÉDIO COMPLETO	5	6,94%

ENSINO MÉDIO INCOMPLETO	7	9,72%
ENSINO SUPERIOR INCOMPLETO	1	1,39%

ESTADO CIVIL	72	100 %
CASADO	32	44,44
DIVORCIADO	3	4,17
SOLTEIRO	20	27,78
UNIÃO CONSENSUAL	11	15,28
VIÚVO	6	8,33

RENDIA	67	100 %
0-1/2S	12	17,91
1/2-1S	17	25,37
1S	22	32,84
2S	12	17,91
3S	3	4,48
5S	1	1,49

Quando questionados sobre os hábitos de vida, 17 dos 74 pacientes que responderam a esta pergunta, declararam que eram tabagistas e 30 que já foram, ou seja, a maioria dos pacientes fuma ou já fumou durante a vida. De 74 pacientes, a maioria (55,41%) já foi etilista e 25,68% ainda é. A maioria dos pacientes (51,61%) nunca usa camisinha, 41,94% respondeu que usa “às vezes” e apenas 4 pacientes responderam que sempre usam camisinha (n=62). Estes dados são demonstrados na tabela 3.

TABELA 3: Hábitos de vida dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis no Estado do Maranhão.

TABAGISMO	74	100%
EX TABAGISTA	30	40,54%
NÃO	27	36,49%
SIM	17	22,97%

ELITISMO	74	100%
EX ELITISTA	41	55,41%
NÃO	12	16,22%

SIM	19	25,68%
-----	----	--------

USO DE CAMISINHA	62	100%
AS VEZES	26	41,94
NUNCA	32	51,61
SEMPRE	4	6,45

Com relação aos hábitos de higiene, fator fortemente ligado ao desenvolvimento do câncer de pênis, a tabela 4 mostra a frequência de pacientes que afirmaram ter hábitos de higiene adequados. Quando perguntados sobre a higiene peniana, a maioria (74,24%) respondeu que higieniza a região, porém, destes, apenas um pouco mais da metade (51,16%) expõe a glândula totalmente durante a higienização.

TABELA 4: Hábitos de higiene na região peniana em pacientes com câncer de pênis no estado do Maranhão.

HIGIENE COTIDIANA	66	100 %
NÃO	17	25,76
SIM	49	74,24
EXPOSIÇÃO DA GLÂNDULA	43	100 %
NÃO	8	18,60
PARCIAL	13	30,23
TOTAL	22	51,16

TABELA 5: Características histopatológicas das amostras com câncer de pênis no estado do Maranhão.

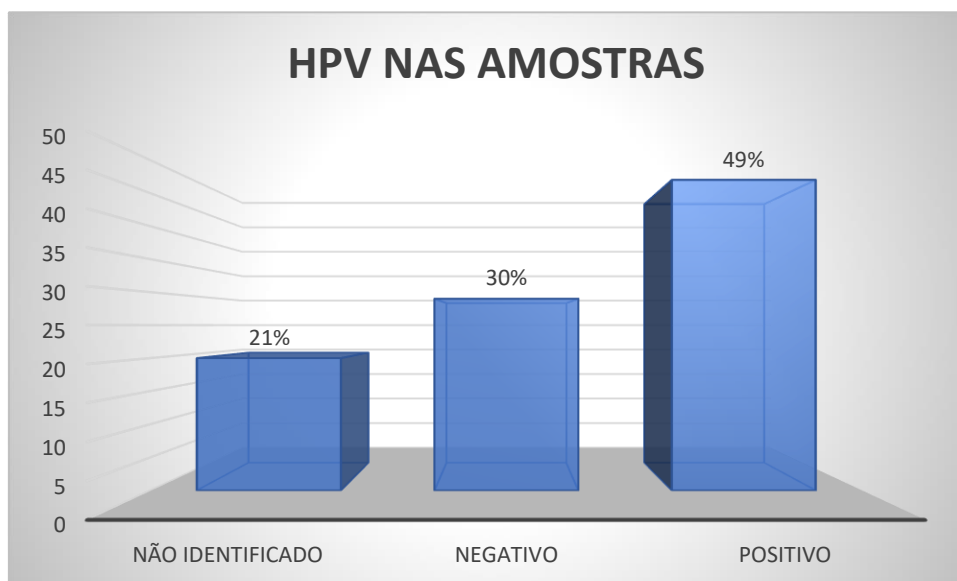
HISTOLOGIA	75	100 %
CEC	75	100,00
LOCAL DA LESÃO	51	100 %
CORPO DO PENIS	4	7,84
GLÂNDULA	32	62,75
GLÂNDULA - CORPO DO PENIS - PREPUCIO	6	11,76
GLÂNDULA - PREPUCIO	6	11,76
PREPUCIO	2	3,92
SULCO BALANOPREPUCIAL	1	1,96
SUBTIPO	24	100 %
BASALOIDE	3	12,50

CERATINIZANTE	1	4,17
CONDILOMATOSO	12	50,00
SEM OUTRA ESPECIFICAÇÃO	1	4,17
USUAL	6	25,00
VERRUCOSO	1	4,17
GRAU DE BRODERS	58	100 %
I	20	34,48
II	20	34,48
III	18	31,03
T	54	100 %
pT1	1	1,85
pT1a	6	11,11
pT1b	7	12,96
pT2	17	31,48
pT3	16	29,63
pT4	3	5,56
pTis	4	7,41
N	44	100 %
N0	1	2,27
NX	5	11,36
pN0	1	2,27
pN1	1	2,27
pN2	2	4,55
pN3	3	6,82
pNX	31	70,45
M	25	100 %
MX	4	16,00
pMX	21	84,00
INVASAO PERINEURAL	41	100 %
NÃO	29	70,73
SIM	12	29,27
INVASAO ANGIOLINFATICA	46	100 %
NÃO	22	47,83
SIM	24	52,17

5.2 Detecção e identificação de tipos de HPV presente

Foi realizada a PCR para identificação do HPV em 59 amostras que continham material suficiente para esta análise e aquelas em que o DNA viral foi identificado (43 amostras) foram encaminhadas para Portugal para identificação do subtipo viral. O gráfico 3 mostra a frequência de detecção do DNA viral nas amostras de câncer de pênis.

GRÁFICO 3: Detecção de DNA viral do HPV nas amostras



Através da genotipagem pelo método Anyplex foi possível identificar os tipos virais em 26 das 43 amostras que foram positivas para o HPV. O restante das amostras (17 amostras) não tinha DNA suficiente para a identificação do tipo viral.

O método Anyplex traz como grande vantagem em relação ao método de sequenciamento habitualmente realizado (Sanger's) a possibilidade de identificação do tipo viral mesmo naquelas amostras que apresentam múltipla infecção (mais de um tipo de HPV). O que representou uma grande vantagem para esta pesquisa, visto que na nossa população de estudo uma grande parte das amostras tinham mais de um subtipo identificado.

A tabela 6 mostra a frequência de detecção de cada tipo de HPV identificado nas amostras. Considerando que haviam amostras em que foram detectados mais de um tipo viral, a maior frequência de detecção foi representada pelo HPV 11, presente em 49% (n=23) das amostras analisadas e pelo HPV 16 que estava presente em 36% (n=17), seguidos do HPV 18 com 11% (n=5), o HPV 40 com 9%, o HPV 39, 45, 53 e 66 ambos com 4% (n=2), e o HPV 6, 34, 35, 42, 43, 52, todos com 2% (n=1). Em 9% das amostras não foi possível identificar o tipo de HPV presente porque não havia DNA suficiente na amostra enviada.

TABELA 6: Frequência dos tipos de HPV identificados nas amostras

GENÓTIPO	FREQUÊNCIA ABSOLUTA	FREQUÊNCIA RELATIVA
----------	---------------------	---------------------

TIPO 6	1	2%
TIPO 11	23	49%
TIPO 16	17	36%
TIPO 18	5	11%
TIPO 34	1	2%
TIPO 35	1	2%
TIPO 39	2	4%
TIPO 40	4	9%
TIPO 42	1	2%
TIPO 43	1	2%
TIPO 45	2	4%
TIPO 52	1	2%
TIPO 53	2	4%
TIPO 61	3	6%
TIPO 66	2	4%
Sem DNA	4	9%

Buscamos saber se a presença de HPV estava associada com variáveis do perfil sociodemográfico, relacionadas aos hábitos de vida do paciente e também a classificação histopatológica do tumor. Foram escolhidas as seguintes variáveis: escolaridade, tabagismo, etilismo, grau de Broders, grau de invasão perineural, invasão angiolinfática e estadiamento (T, N, M). Dentre estas, encontramos um valor de p significativo ($p < 0,05$) apenas na associação da presença de HPV com o grau de escolaridade dos pacientes. Sendo a maioria deles (84,21%) analfabetos.

Com relação aos hábitos de vida registrados, foi verificado se havia associação entre a presença ou ausência de HPV nas amostras e o tabagismo e etilismo. Não encontrando um p valor significativo em nenhuma das duas associações.

TABELA 7: Associação entre o grau de escolaridade e a presença ou ausência de HPV nas amostras

ESCOLARIDADE	HPV		
	NEGATIVO	POSITIVO	Pvalor
ANALFABETO	15.79%	84,21%	0.0426
ENSINO FUNDAMENTAL COMPLETO	22.22%	77.78%	0.2419
ENSINO FUNDAMENTAL INCOMPLETO	64.29%	35.71%	0.0240
ENSINO MÉDIO COMPLETO	20%	80%	0.6451
ENSINO MÉDIO INCOMPLETO	100%	0%	0.0140
ENSINO SUPERIOR INCOMPLETO	100%	0%	0.3607

TABELA 8: Associação entre o tabagismo e a presença ou ausência de HPV nas amostras

TABAGISMO	HPV		Pvalor
	NEGATIVO	POSITIVO	
TABAGISTA	90.91%	9.09%	>0.9999
NÃO-TABAGISTA	91.67%	8.33%	0.6908
EX-TABAGISTA	85.71%	14.29%	0.6613

TABELA 9: Associação entre o etilismo e a presença ou ausência de HPV nas amostras

ELITISMO	HPV		Pvalor
	NEGATIVO	POSITIVO	
ELITISTA	89.47%	10.53%	>0.9999
NÃO-ELITISTA	100%	0%	>0.9999
EX-ELITISTA	85.71%	14.29%	0.6743

TABELA 10: Associação entre o grau de Broders e a infecção pelo HPV

Variável	HPV		P valor
	Negativo (n=6)	Positivo (n=19)	
Broders I	4 (40,00%)	5 (26,32%)	0.6749
Broders II	1 (16,67%)	9 (47,37%)	0.3449
Broders III	1 (16,67%)	5 (26,32%)	>0.9999

TABELA 11: Associação entre a invasão perineural do tumor e a presença de HPV na amostra.

Variável	HPV		P valor
	Negativo (n=10)	Positivo (n=28)	
Invasão perineural	3 (30,00%)	6 (21,43%)	0.6731

TABELA 12: Associação entre a invasão angiolinfática do tumor e a presença de HPV na amostra.

Variável	HPV		P valor
	Negativo (n=10)	Positivo (n=30)	
Invasão angiolinfática	3 (30,00%)	8 (26,67%)	>0.9999

TABELA 13: Associação entre estadiamento do tumor e a presença de HPV na amostra.

Variável	HPV		P valor
	Negativo (n=10)	Positivo (n=30)	
Estágio I	2 (20,00%)	10 (33,33%)	0.6927
Estágio II	7 (70,00%)	18 (60,00%)	0.7148
Estágio III	1 (10,00%)	1 (3,33%)	0.4423
Estágio IV	0 (0,00%)	1 (3,33%)	>0.9999

5.3 Estudo da expressão das Metaloproteinases e Timp's

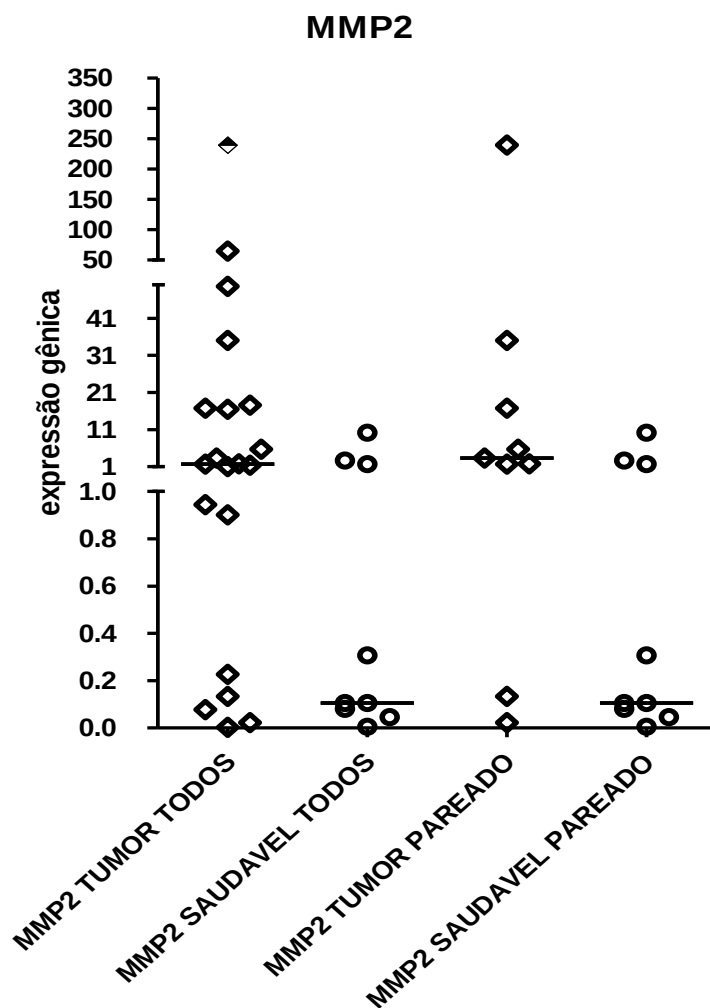
Foi realizada a seleção dos pacientes de acordo com os critérios de dados de HPV (ausente ou presente) apresentados e algum dado patológico (ou TNM ou Broder's). Foi isolado o RNA de todas as amostras com sucesso e foi produzido cDNA.

Para estudar as possíveis alterações da expressão de Metaloproteinases e TIMP'S, começamos por comparar os seus níveis de expressão dos respectivos genes em amostras tumorais e em amostras de tecido adjacente não tumoral.

Os níveis de expressão de todos os genes foram bastante baixos, com a maioria das amostras a apresentar valores de CT superiores a 30. Inicialmente, foram comparados os níveis de expressão gênica de todas as amostras tumorais disponíveis com todas as amostras sadias disponíveis, independentemente de serem ou não amostras pareadas de cada paciente. Em seguida, a análise foi repetida apenas em pacientes com amostras tumorais e sadias pareadas.

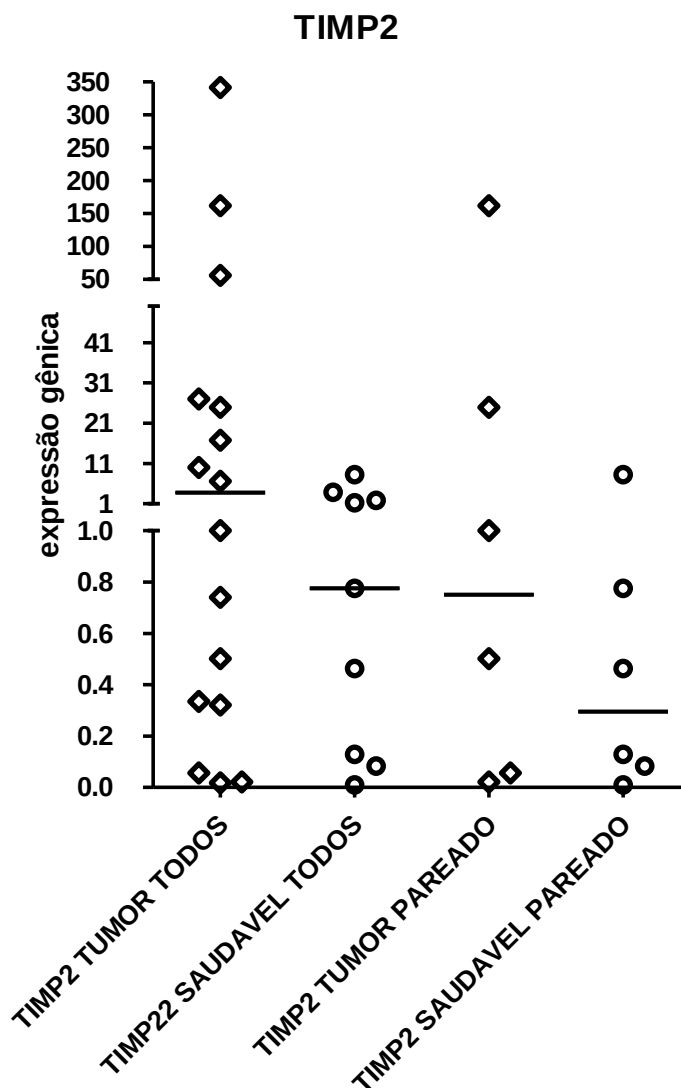
Nestas análises, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhum dos genes estudados, entre amostras tumorais e sadias, usando as duas abordagens referidas.

Gráfico 4. Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de MMP2 em amostras de CP e de tecido adjacente



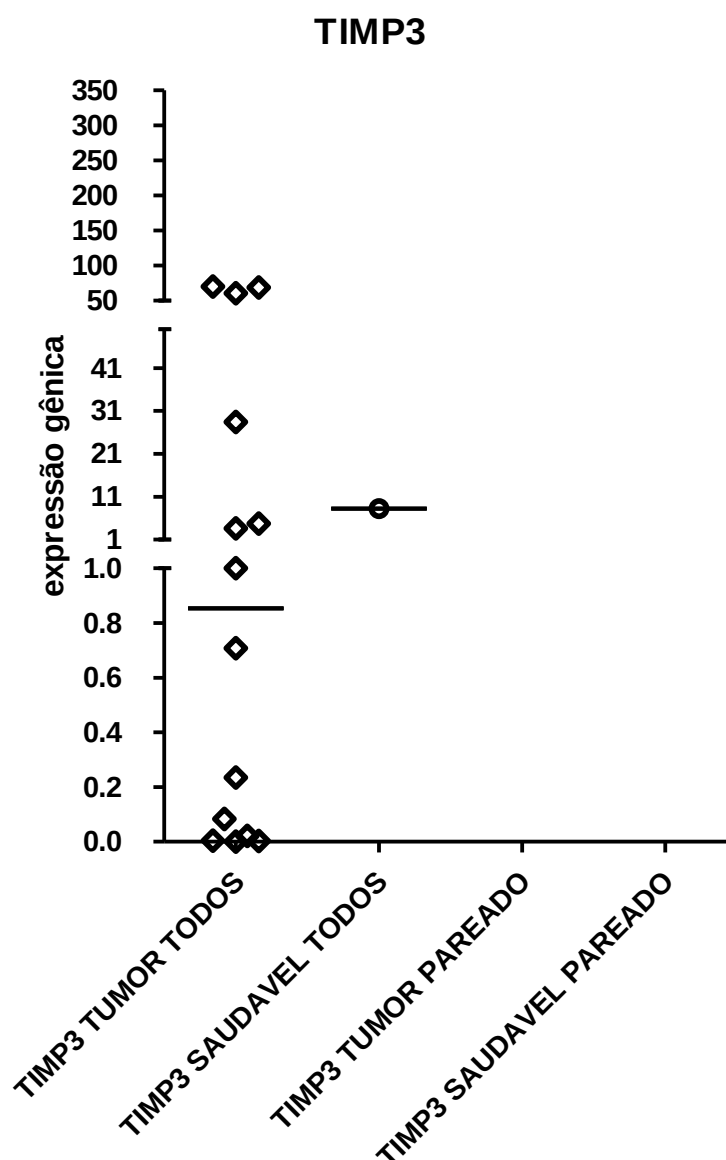
Legenda: Losangos = amostras de CP; Círculos = tecido adjacente. Foram comparadas amostras sem pareamento (primeiros dois grupos) e amostras pareadas (últimos dois grupos). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney para ambas as análises. Fonte: próprio autor.

Gráfico 5. Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP2 em amostras de CP e de tecido adjacente



Legenda: Losangos = amostras de CP; Círculos = tecido adjacente. Foram comparadas amostras sem pareamento (primeiros dois grupos) e amostras pareadas (últimos dois grupos). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney para ambas as análises. Fonte: próprio autor.

Gráfico 6. Níveis de expressão gênica ($2\Delta\Delta CT$) de TIMP3 em amostras de CP e de tecido adjacente



Legenda: Losangos = amostras de CP; Círculos = tecido adjacente. Foram comparadas amostras sem pareamento (primeiros dois grupos) e amostras pareadas (últimos dois grupos). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney para ambas as análises. Fonte: próprio autor.

5.3.1 Níveis de expressão de genes de MMP2, TIMP2 e TIMP3 e variáveis clínico-patológicas.

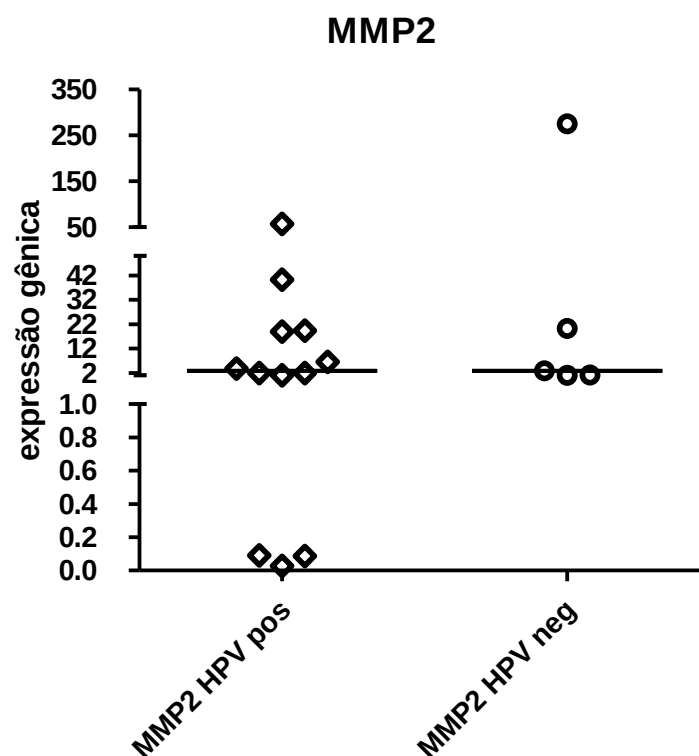
Foi estudada a relação entre os níveis de expressão gênica de MMP2, TIMP2 e TIMP3, com a presença ou ausência de DNA de HPV, com a presença de tipos de HPV de alto risco ou apenas HPVs de baixo risco, com a presença de invasão perineural e angiolinfática, com o grau histológico (categorizado como baixo – grau I ou como alto

– graus II ou III), estadiamento TNM (categorizado como baixo se inferior a T2 sem envolvimento linfonodal e como alto se igual ou superior a T2 e se inferior a T2 com envolvimento linfonodal) e com os subtipos histológicos presentes (agrupados como subtipos relacionados com o HPV e subtipos independentes do HPV).

5.3.1.1 Níveis de expressão do gene de MMP2 e variáveis clínico-patológicas

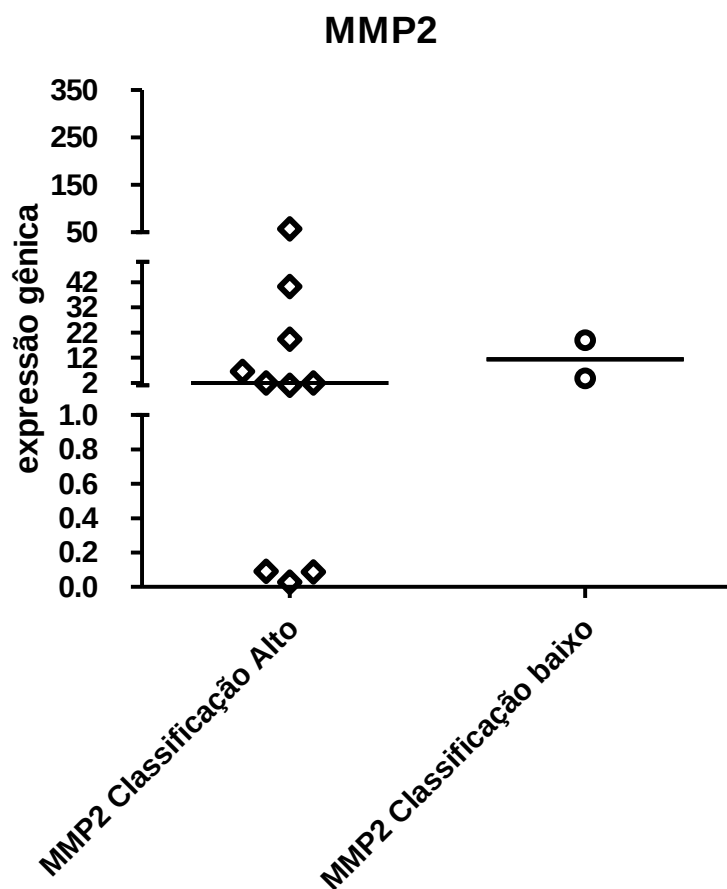
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão de MMP2 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invasão perineural, invasão angiolinfática, com o grau histológico, estadiamento TNM nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 16 ao 21).

Gráfico 7. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo



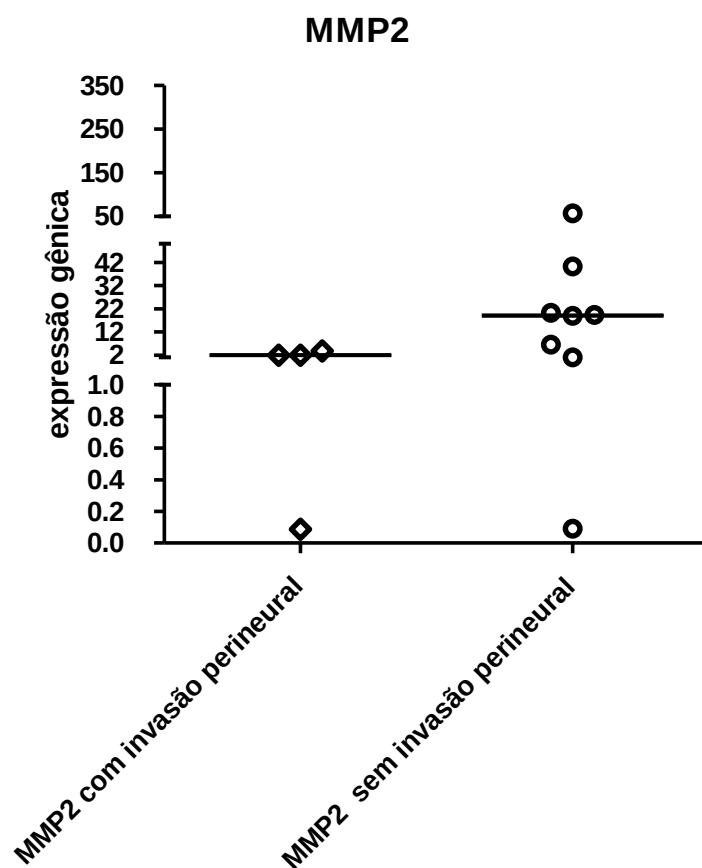
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo ($n = 12$); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo ($n = 5$). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 7. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



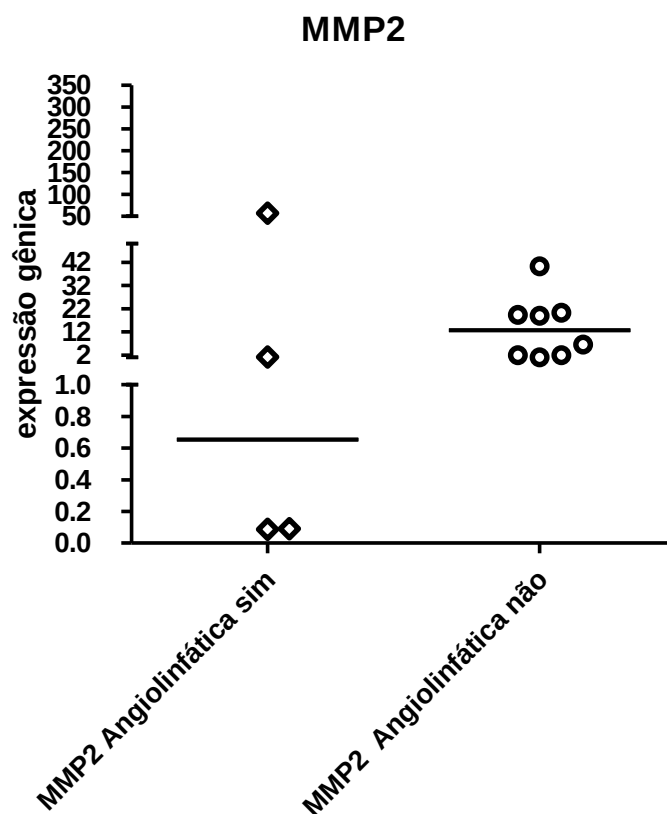
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco (n = 10); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco (n = 2). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. P > 0,05 no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 8. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



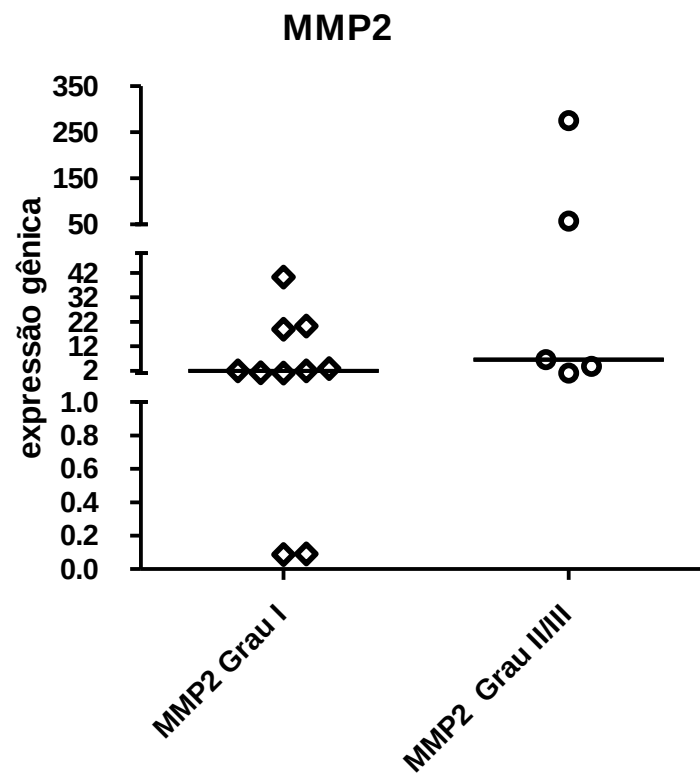
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural (n = 4); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural (n = 8). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. P = 0,028 no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 9. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP com e sem invasão angiointerferente.



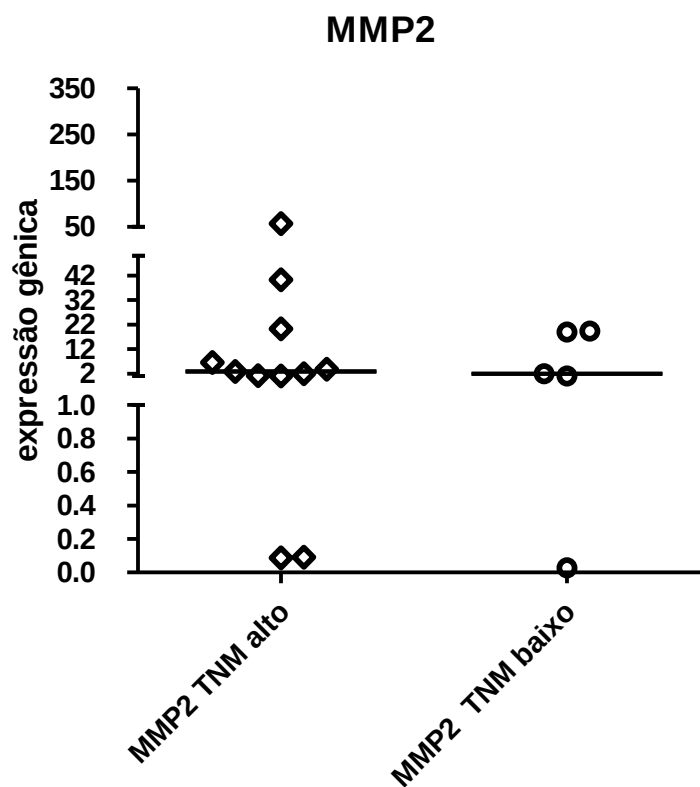
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angiointerferente (n = 4); Círculos = amostras de CP sem invasão angiointerferente (n = 8). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 10. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



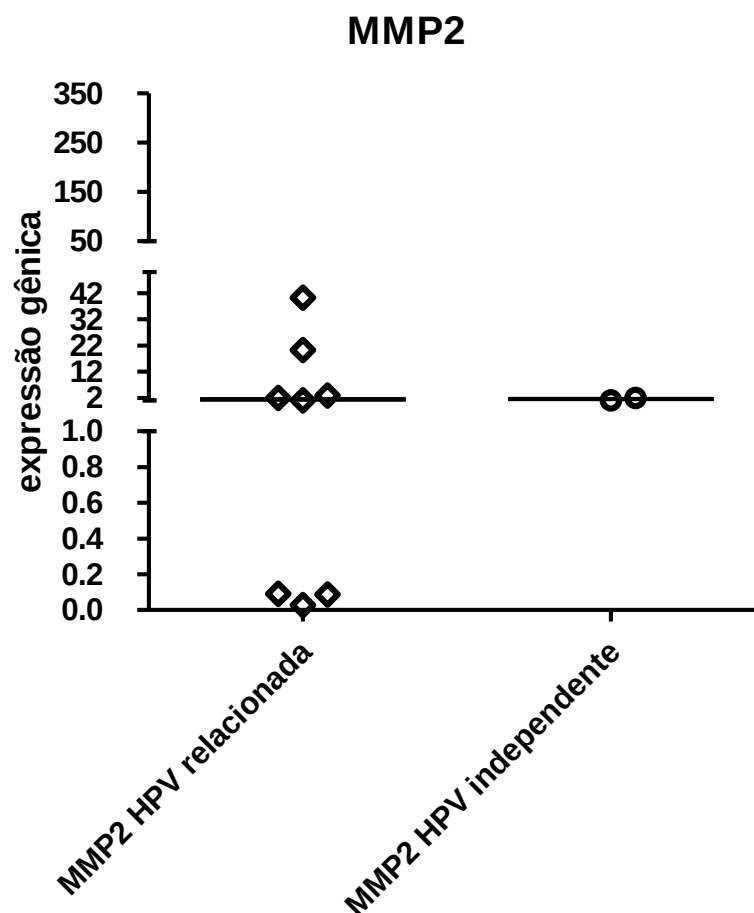
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I (n = 10); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III (n = 5). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. P > 0,05 no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 11. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto (n = 11); Círculos = amostras de CP com TNM baixo (n = 5). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney.
 Fonte: próprio autor.

Gráfico 12. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) das MMP2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.

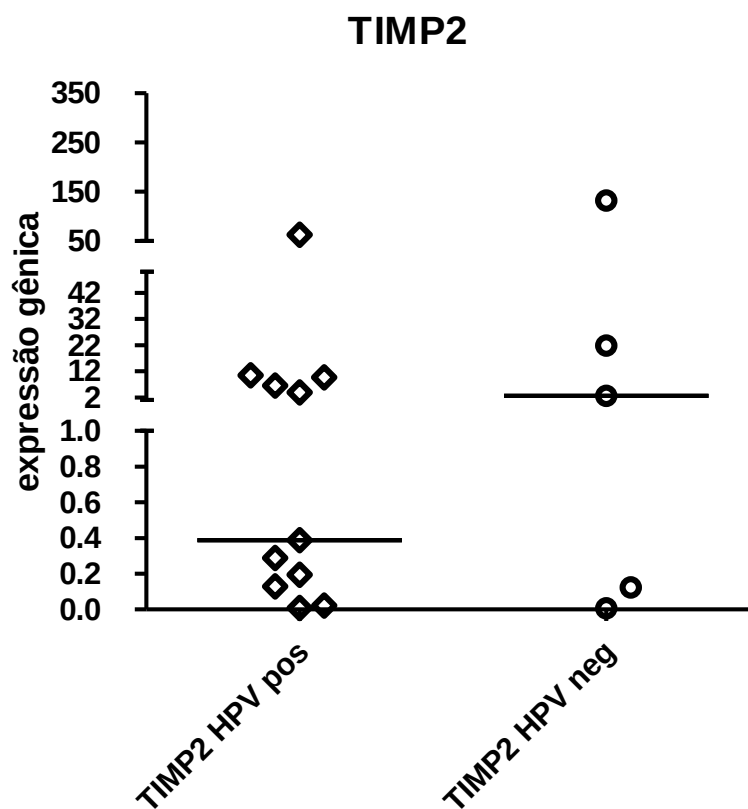


Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV (n = 8); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV (n = 2). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

5.3.1.2 Níveis de expressão do gene de TIMP2 e variáveis clínico-patológicas

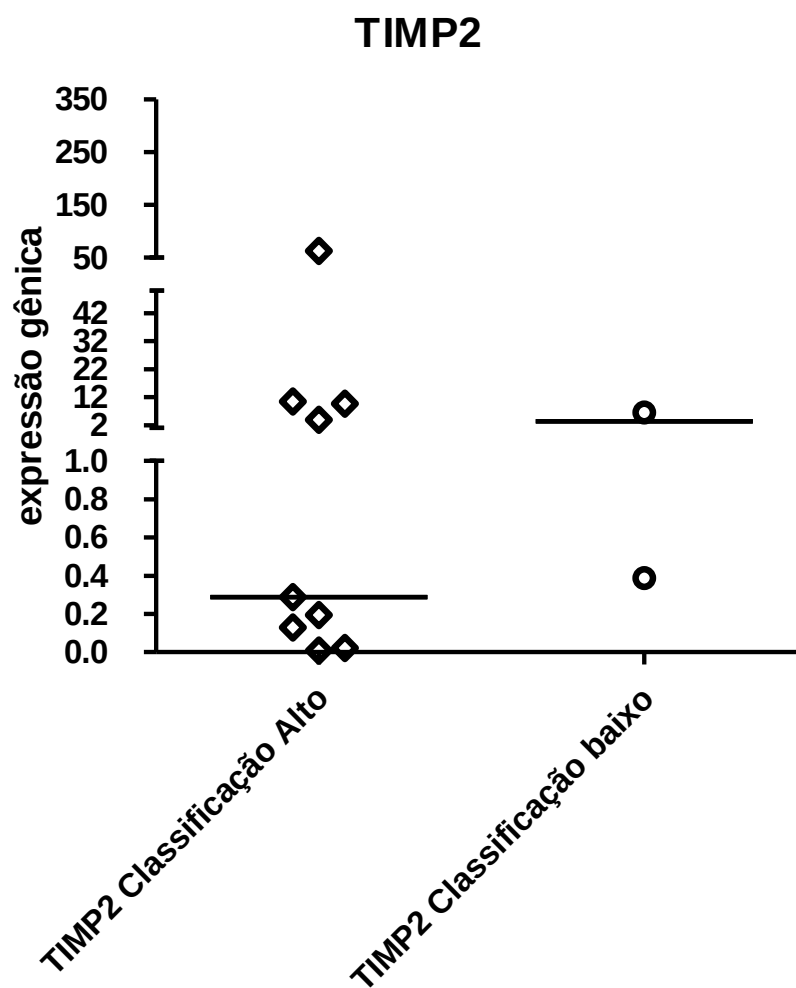
Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão de TIMP2 e a presença de DNA de HPV, os tipos de HPV presentes, com a presença de invasão perineural, invasão angiolinfática, com o grau histológico, estadiamento TNM nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 16 ao 21).

Gráfico 13. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo



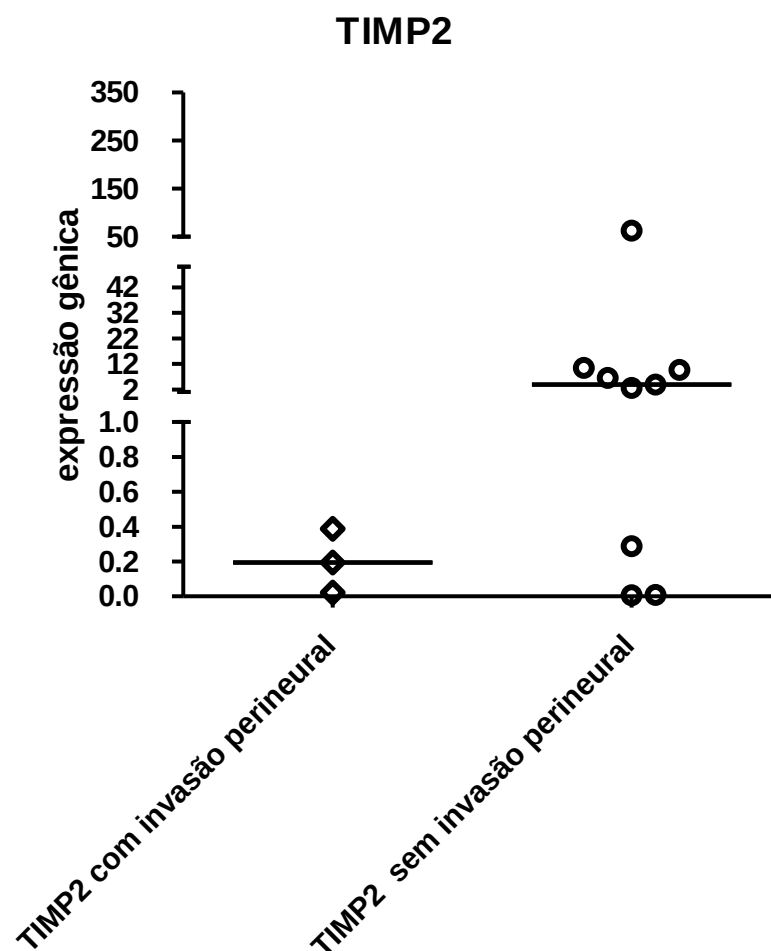
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo (n = 11); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo (n = 5). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 14. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



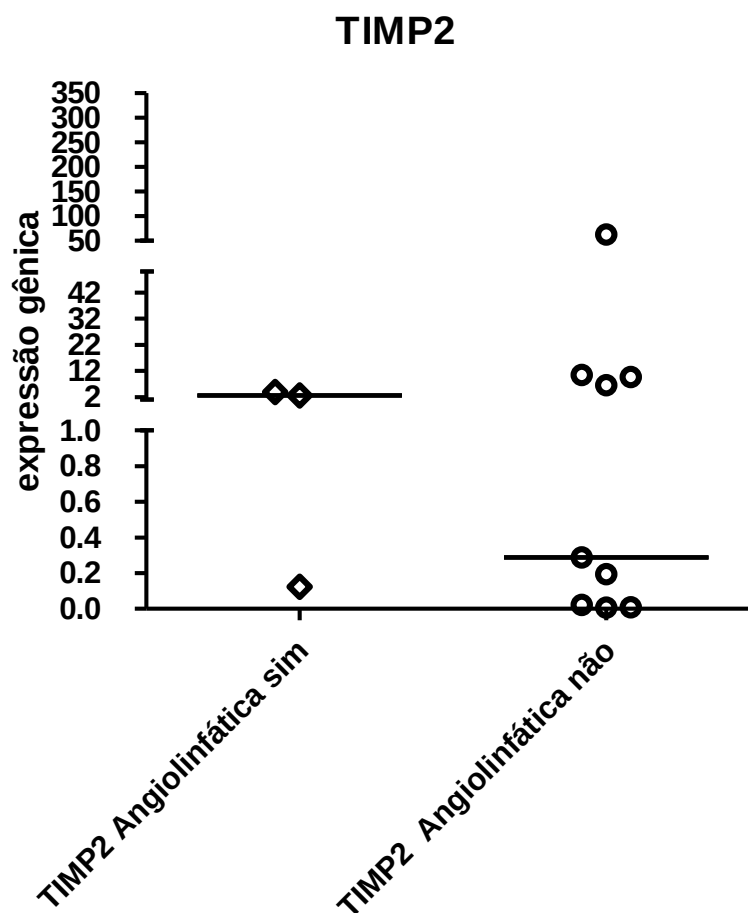
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco (n = 9); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco (n = 2). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 15. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



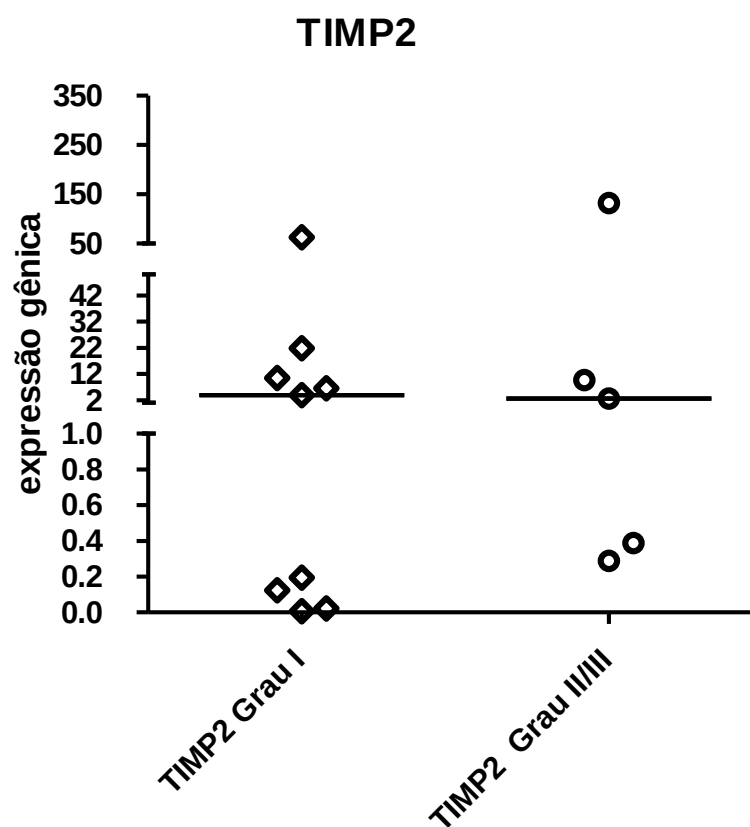
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural (n = 3); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural (n = 9). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 16. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP com e sem invasão angiointerferente.



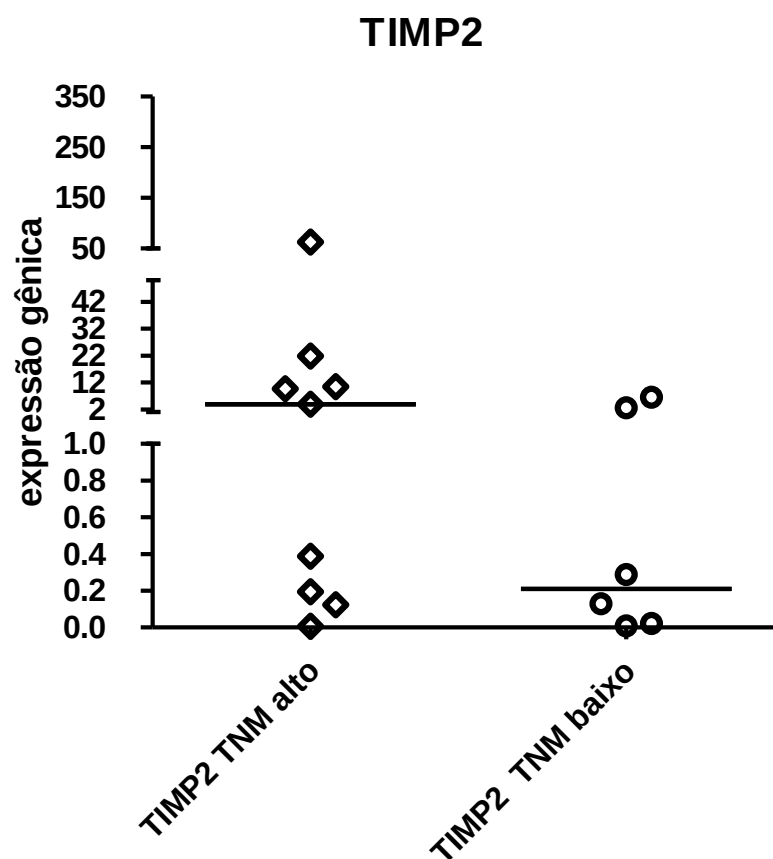
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angiointerferente (n = 3); Círculos = amostras de CP sem invasão angiointerferente (n = 9). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 17. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



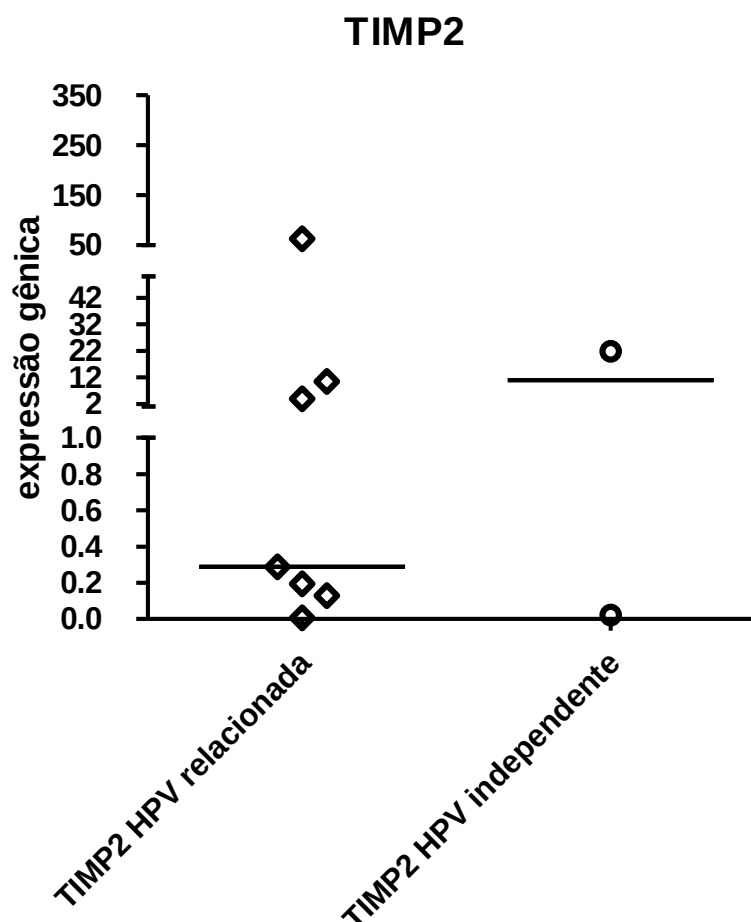
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I (n = 9); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III (n = 5). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 18. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto (n = 9); Círculos = amostras de CP com TNM baixo (n = 6). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney.
Fonte: próprio autor.

Gráfico 19. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP2 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.

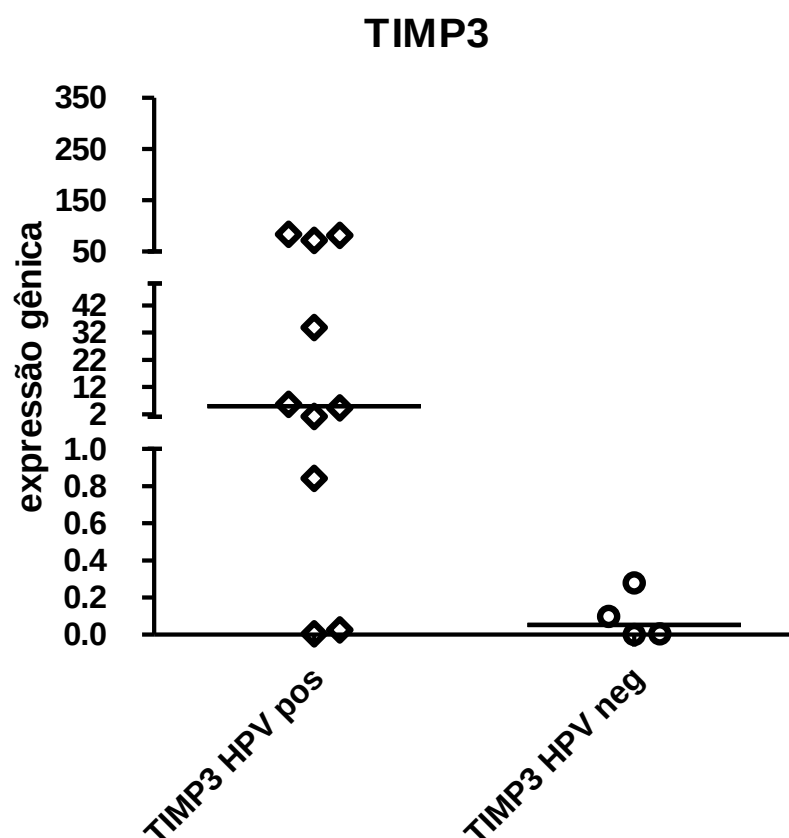


Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV (n = 7); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV (n = 2). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

5.3.1.3 Níveis de expressão do gene de TIMP3 e variáveis clínico-patológicas

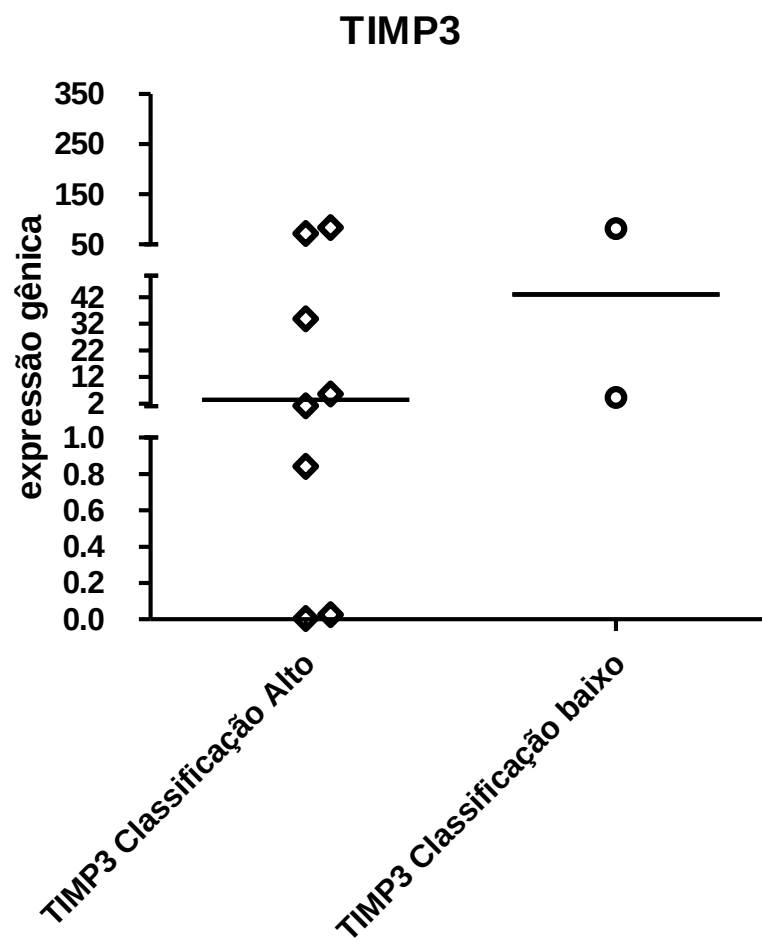
Foi observada uma associação significativa entre níveis reduzidos de TIMP3 e a presença de DNA de HPV ($p = 0,0360$ no teste de Mann-Whitney no Gráfico 20). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de expressão do TIMP3 e os tipos de HPV presentes, nem com a presença de invasão perineural, invasão angiolinfática, grau histológico, estadiamento TNM, nem com os subtipos histológicos presentes ($p > 0,05$ nos Gráficos 21 a 24).

Gráfico 20. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP com DNA de HPV positivo e negativo



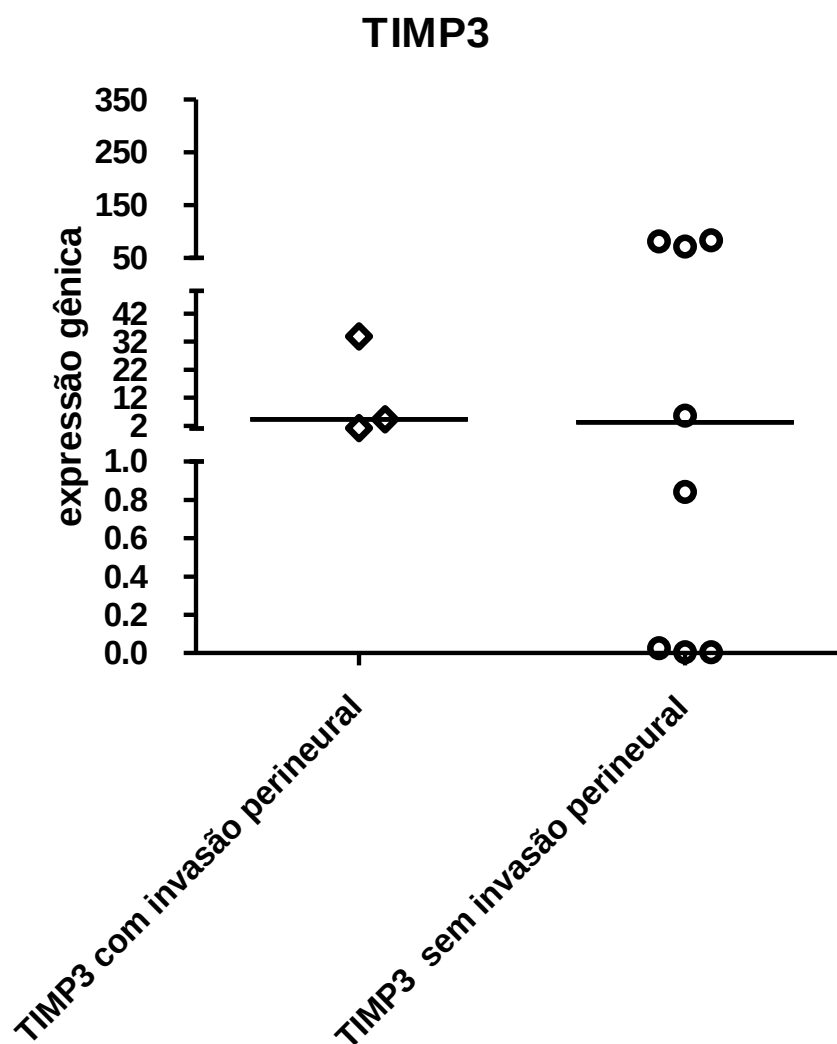
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV positivo (n = 10); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV negativo (n = 4). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. P= 0,0360 no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 21. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP com DNA de HPV de alto e baixo risco.



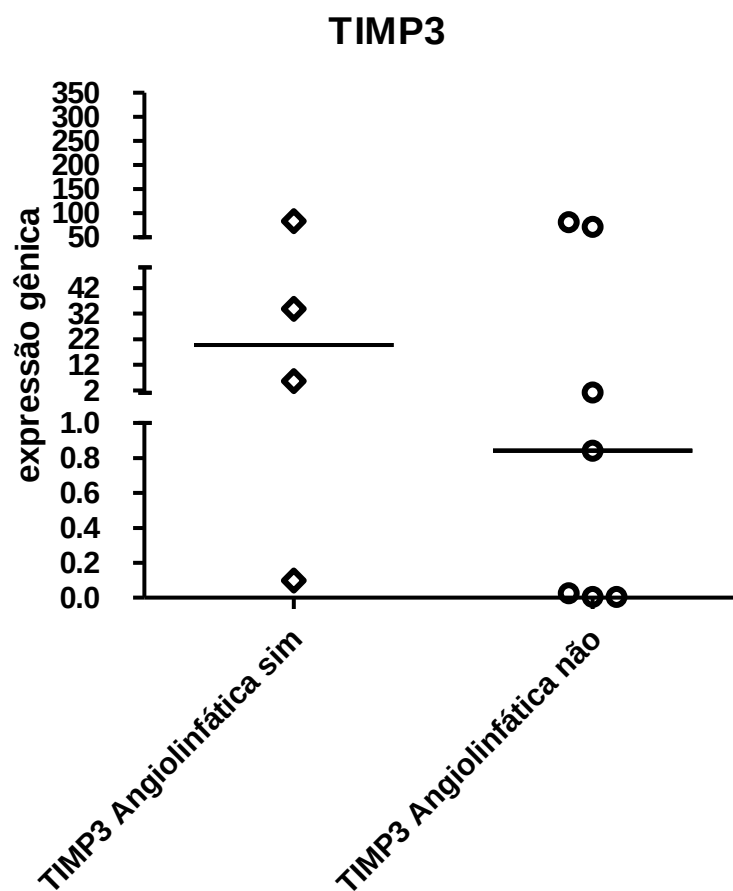
Legenda: Losangos = amostras de CP com DNA de HPV de alto risco (n = 8); Círculos = amostras de CP com DNA de HPV de baixo risco (n = 2). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 22. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP com e sem invasão perineural.



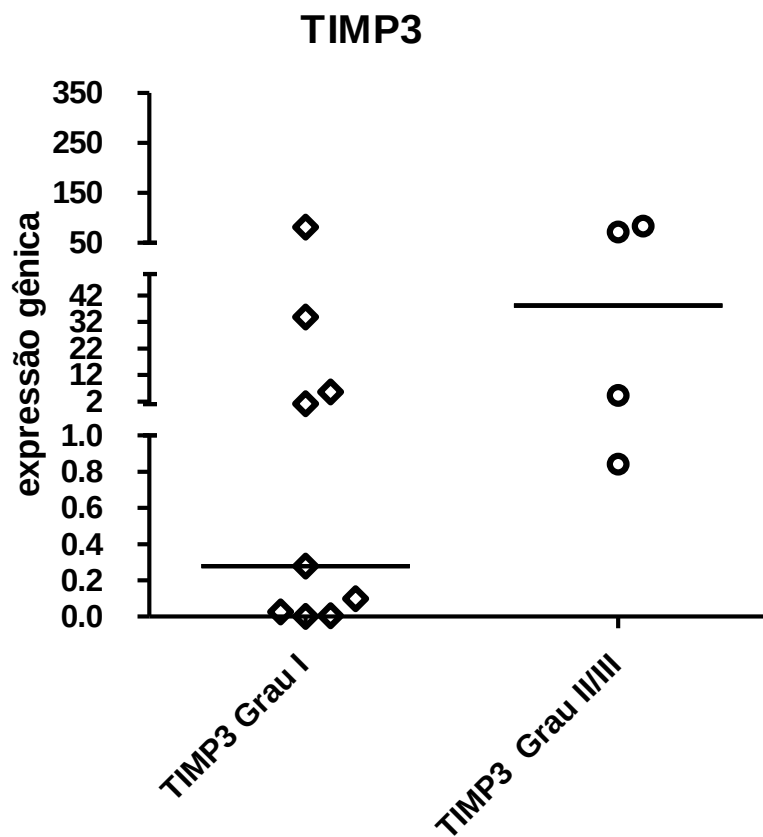
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão perineural (n = 3); Círculos = amostras de CP sem invasão perineural (n = 8). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 23. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP com e sem invasão angiointerferente.



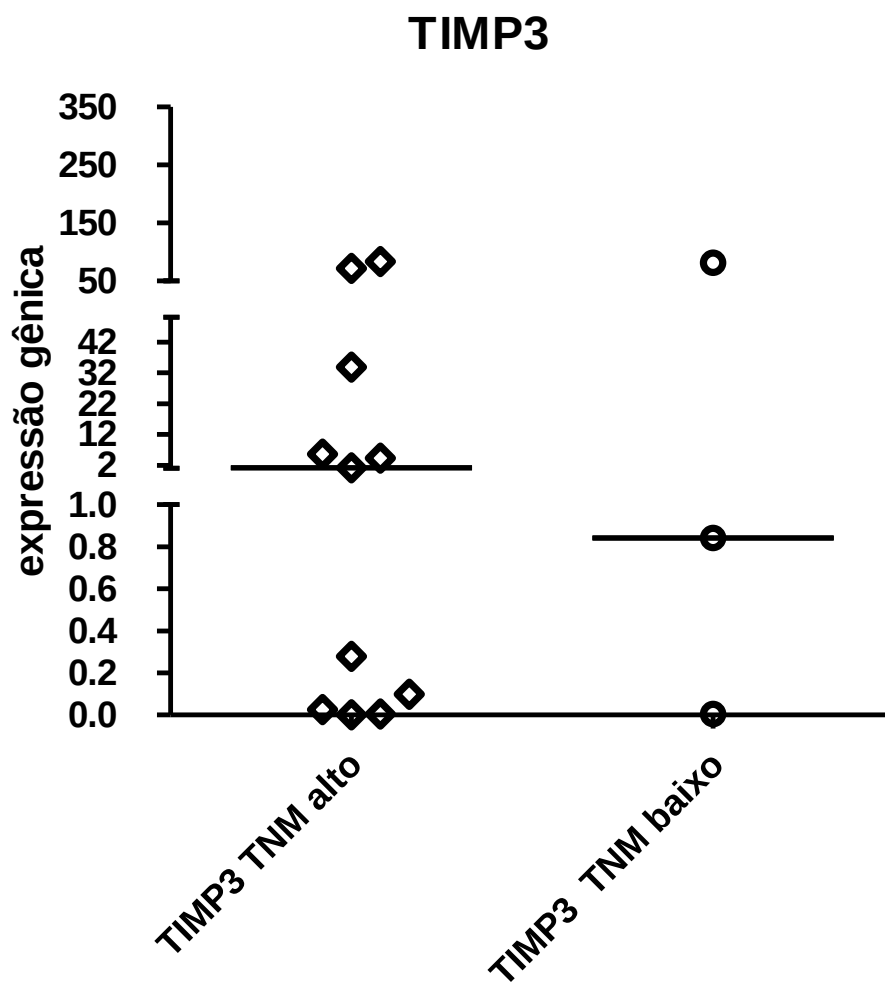
Legenda: Losangos = amostras de CP com invasão angiointerferente (n = 4); Círculos = amostras de CP sem invasão angiointerferente (n = 7). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 24. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP com Grau de Broders I e II/III.



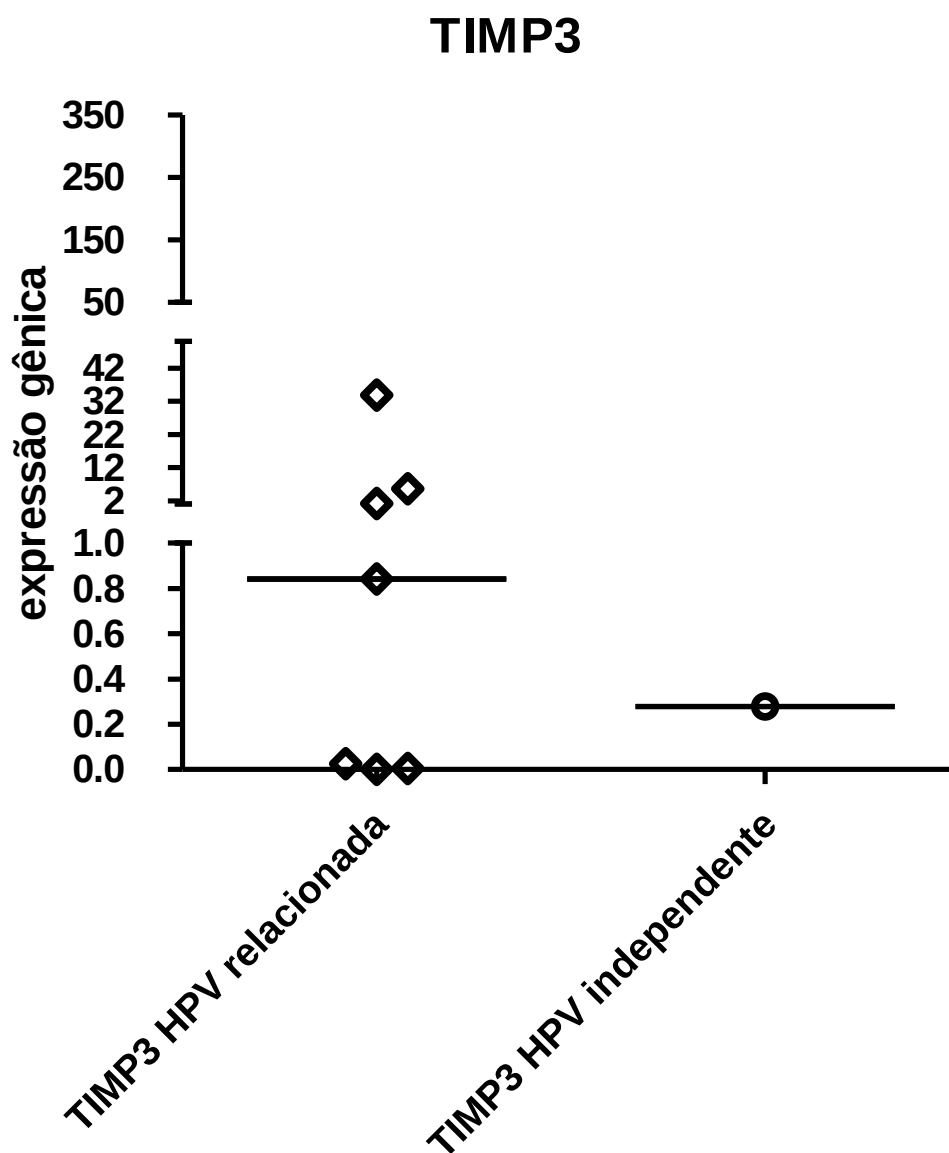
Legenda: Losangos = amostras de CP com Grau de Broders I (n = 9); Círculos = amostras de CP Grau de Broders II/III (n = 4). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 25. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP com TNM alto e baixo.



Legenda: Losangos = amostras de CP com TNM alto (n = 11); Círculos = amostras de CP com TNM baixo (n = 3). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. $P > 0,05$ no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

Gráfico 26. Níveis expressão gênica ($2^{\Delta\Delta CT}$) de TIMP3 em amostras de CP relacionadas ou não com os subtipos de HPV.



Legenda: Losangos = amostras de CP relacionadas com subtipo de HPV (n = 7); Círculos = amostras de CP independentes do subtipo de HPV (n = 1). A média de cada grupo é indicada pela barra transversa. P > 0,05 no teste de Mann-Whitney. Fonte: próprio autor.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam que a média de idade dos pacientes analisados era de 64 anos. Os dados encontrados fortalecem o que está descrito na literatura que afirma que a incidência de penectomia é mais prevalente em homens sexagenários (CHAUX et al., 2013). A cirurgia de penectomia nesta faixa etária é observada também nos trabalhos de Fay (2014); Chaux e col. (2013); Sousa (2015) e Ramos (2017). Podemos assim afirmar que o câncer de pênis acontece predominantemente em idosos, assim como o diagnóstico é mais comum aos 60 anos.

Vale aqui ressaltar que não se descarta a hipótese de ocorrência do carcinoma peniano também em homens jovens, fato este observado neste estudo em que a menor idade de diagnóstico era 30 anos. Interessante destacar também que apesar da idade média encontrada neste estudo, maior que 60 anos, pacientes no estudo de Lobrigatte (2014) foram diagnosticados aos 80 anos. Este fato pode ser explicado pelo atraso no diagnóstico, ou porque o paciente tem dificuldade de acesso ao serviço de saúde ou porque tem medo, ou ainda por falta de conhecimento do paciente.

Neste estudo, 64,79% dos indivíduos possuíam residência em localidades do interior do estado do Maranhão. Estes dados estão em conformidade com os resultados de Ramos (2017), em que 79,3% dos participantes residiam no interior do Maranhão. Da mesma forma, o estudo de Chaux (2013) revelou a incidência de 83% dos participantes residindo em áreas afastadas dos grandes centros urbanos. Este fato pode ser associado a uma questão geográfica, visto que o Maranhão é um estado que apresenta extensa área territorial e alguns municípios muito afastados da capital, o que dificulta a busca por serviço especializado de saúde. Isto explica a dificuldade por parte dos pacientes residentes no interior do estado em realizar o diagnóstico de forma precoce.

No levantamento feito por este estudo, fatores como escolaridade, renda familiar e o estado civil também foram avaliados. Foram detectados a existência predominante de homens analfabetos e com renda familiar de até um salário-mínimo. Estes resultados encontram-se em concordância com os achados na literatura que afirmam que o câncer de pênis acomete homens com baixo nível social e de instrução (HERNADEZ, 2008; RAMOS, 2017; COSTA, 2013; TORBRAND et al., 2017). Torbrand (2017) alude que homens com um baixo nível de escolaridade estão mais suscetíveis ao desenvolvimento do carcinoma peniano. No estudo de Ramos (2017), o câncer de pênis estava presente em 55,2% dos homens analfabetos e que apresentavam uma renda familiar de até um salário-mínimo, 75,9% dos participantes.

A escolaridade é sem dúvidas um fator associado ao desenvolvimento de um raciocínio crítico e de consciência social. Sendo a escola o local onde o indivíduo forma opiniões e reúne conhecimento acerca de diversos assuntos, dentre eles conhecimento em saúde e ambiente. Tendo assim a oportunidade de realizar uma escolha favorável à sua saúde. Assim, pessoas com baixa instrução estão suscetíveis por não terem a ideia de quando precisam buscar ajuda médica.

No que diz respeito a raça dos indivíduos com câncer de pênis, observou-se neste estudo que a neoplasia peniana foi maior em homens não brancos. Sendo a maioria de raça parda (62,67%). Este achado corrobora com o que foi descrito por Allebrant (2013), em que os indivíduos mais acometidos pelo carcinoma peniano, além de possuírem baixas condições socioeconômicas, eram de cor/raça parda e preta.

Quanto aos hábitos de vida, neste trabalho grande parte dos pacientes (63,51%) já fizeram uso de tabaco. Daling (2014) identificou a ligação entre o uso de tabaco e o desenvolvimento da neoplasia peniana, tanto fumante, quanto ex-fumante possuem chances de desenvolver o câncer peniano, 2,3 e 1,9 razões de chance, respectivamente. Ramos (2017) demonstrou em seu estudo que 62% dos pacientes diagnosticados com câncer de pênis faziam, ou fizeram, uso do tabaco. No estudo realizado por Wanick (2015), o tabagismo foi detectado em 75% dos casos com a neoplasia invasiva no pênis. Chaux et al. (2013) revelou em sua pesquisa que 76% dos casos de paciente com CP também fizeram uso do tabaco em algum momento da sua vida.

O tabagismo vem sendo descrito ao longo da história como importante fator ambiental carcinogênico, associado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer em variados tipos de epitélio, ainda que não haja contato direto do tecido com as substâncias do fumo. Segundo Wünsch Filho (2010), desde a associação ao câncer de pulmão de Doll e Hill em 1957, o tabagismo foi associado como principal causa em mais de 20 tipos de tumores malignos, incluindo o câncer de ovário e o de cólon.

Os hábitos de higiene são um fator importante para a prevenção do câncer de pênis, conforme observado por Chaux et al. (2013). Neste estudo, 38% dos pacientes não faziam higiene após as relações sexuais, enquanto no de Ramos (2017) 24,1% também não faziam a devida higiene, podendo ser este um fator que influencia o desenvolvimento do carcinoma peniano. No estudo de Guimarães et al. (2017), realizado na cidade Caxias- MA, sobre o conhecimento dos homens acerca do CP, constatou-se que 53,1% dos homens entrevistados revelaram ter bons hábitos higiênicos algumas vezes, 20,8% afirmaram nunca ter bons hábitos, e apenas 12,5% muito frequentemente buscavam ter bons hábitos de higiene na região peniana.

A falta de hábitos de higiene pode ser explicada por diversos fatores: dificuldade de acesso a água encanada e produtos de higiene, pacientes acometidos por outras comorbidades que dificultam a execução de uma rotina de higiene e ainda falta de conhecimento sobre a importância de fazê-la.

Além da falta de hábitos de higiene, observou-se neste estudo que muitos pacientes são impossibilitados ou desconhecem a forma correta de fazê-la, visto que 48,83% dos pacientes não realizam a exposição da glândula ou a realizam de forma parcial, dificultando assim que seja feita uma higiene adequada da região peniana. Os homens que não realizaram a cirurgia de fimose, que é a dificuldade ou impossibilidade de expor adequadamente a glândula — a cabeça do pênis — devido ao excesso de pele (ou prepúcio) que cobre a região, têm mais chances de desenvolver a doença. Acredita-se que as secreções que permanecem em volta do órgão e o estreitamento do prepúcio são fatores de predisposição desse tipo de câncer.

Sobre a região anatômica afetada pela lesão, observou-se que em 62,75% dos casos, a glândula foi mais afetada. Havia pacientes com acometimento múltiplo da glândula, corpo do pênis e prepúcio (11,76%) e pacientes com acometimento múltiplo da glândula e prepúcio (11,76%). O corpo do pênis foi a região afetada em 7,84% dos pacientes, seguido do prepúcio (3,92%) e do sulco balanoprepucial (1,96%).

No estudo de Ramos (2017), realizado no Maranhão, 57,1% dos casos haviam mais de uma lesão, e em 93,1% das lesões foi observada lesões na região da glândula. Estes resultados encontram-se em concordância com a pesquisa de Wanick (2011), onde a região da glândula foi a mais afetada, 55,5%, em pacientes diagnosticados com CP e 91,1% dos casos em outras regiões do pênis.

No presente estudo, segundo a análise histológica, 100% das amostras, 75 no total, foram classificadas como sendo carcinoma epidermóide invasivo. Da mesma forma acontece no estudo de Ramos (2017), onde das 29 amostras do estudo, todas foram classificadas com carcinoma epidermóide invasivo. Com relação ao subtipo histológico, houve predominância do usual em 33,9% dos casos. Outros estudos também encontraram dado semelhante. Em um estudo com 121 casos de câncer peniano houve a prevalência do subtipo usual em 52% dos casos (VELAZQUEZ; CHAUX; CUBILLA, 2012). Um estudo retrospectivo de 61 pacientes com câncer epidermóide de pênis realizado por Cubilla (2001) identificou o subtipo usual em 59% dos casos, o subtipo basalóide e condilomatoso em 10% dos casos, cada (CUBILLA et al., 2001). Apesar de o subtipo basalóide estar mais associado à infecção por HPV, o mesmo não foi identificado em nosso estudo.

Foi identificado ainda a invasão perineural em 15,2% das amostras analisadas, e a angiolinfática em 18,6% destas. No estudo de Ramos (2017), a invasão perineural foi observada em apenas 3,4% das amostras, enquanto a invasão angiolinfática em 13,8% das amostras, revelando uma prevalência maior, em ambos os estudos.

A regulação da expressão de metaloproteinases 2 e 9 por seus reguladores endógenos (TIMPs) foi agora estudada pela primeira vez em CP, tendo sido obtidos resultados quanto à expressão de MMP2 e de dois de seus reguladores endógenos TIMPs (TIMP2 e TIMP3). Não foram realizadas reações de PCR em tempo real bem-sucedidas para os genes MMP9 e TIMP1, requerendo a preparação de pares de primers alternativos.

Em geral, os níveis de expressão observados para os 3 genes foram baixos, com valores de CT superiores a 30. Em uma primeira análise, comparamos os níveis de expressão gênica em amostras tumorais e em amostras de tecido sadio, não tendo observado diferenças significativas entre os dois grupos. Esta observação pode indicar que a expressão de metaloproteinase 2 e a inibição endógena realizada pelos TIMPs 2 e 3 não é desregulada durante o processo de carcinogênese peniana ou pode refletir uma alteração diferente da expressão gênica em populações celulares diferentes (por exemplo, em células tumorais e estromais), levando a uma manutenção dos níveis de expressão no tecido como um todo. Esta possibilidade poderá ser testada através de estudos imunohistoquímicos ou de imunofluorescência, que permitam determinar a distribuição dos produtos gênicos nos tecidos de CP.

Em seguida, procuramos estudar a relação dos níveis de expressão de cada gene com a presença ou ausência de DNA de HPV e com os subtipos presentes (alto risco versus baixo risco). No entanto, não foi possível observar qualquer diferença entre lesões contendo HPV de alto risco e aquelas apenas com HPV de baixo risco. Esta última análise é limitada no seu poder estatístico pelo baixo número de amostras com HPV de baixo risco, requerendo estudos adicionais.

Os níveis de expressão de cada gene foram também correlacionados com os subtipos histológicos, agrupados como relacionados com HPV e independentes de HPV (CHAUX et al., 2012). Esta foi uma forma alternativa de testar uma possível associação entre cada gene e o HPV. Também nesta abordagem não foram observadas associações com o HPV, sugerindo que os níveis de MMP2 e TIMP2 no CP não dependem da ação do HPV, variando de forma idêntica nas lesões HPV-positivas e HPV-negativas.

A expressão aumentada de metaloproteinases foi associada com o comportamento biológico de vários tipos de câncer (LI et al., 2021). Assim, procuramos testar possíveis associações entre os níveis de expressão do gene para MMP2 e também de seus reguladores endógenos (TIMPs 2 e 3) e importantes variáveis clínico-patológicas relacionadas com o prognóstico dos pacientes, como o grau histológico, o estágio TNM e a presença de invasão perineural e angiolinfática. Os presentes resultados não demonstraram associações estatisticamente singificativas entre a expressão dos genes estudados e essas variáveis clínico-patológicas, reforçando a necessidade de estudos adicionais para esclarecer o seu papel no comportamento biológico do câncer de pênis.

No conjunto de resultados obtidos, destaca-se a associação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de TIMP3 e a presença de infecção pelo vírus HPV. Esta é uma importante observação uma vez que a baixa expressão do gene de TIMP3, nas amostras de CP que são HPV positivas condiciona a falha da inibição da expressão de metaloproteinases, normalmente feita pelo TIMP3. Isto pode contribuir decisivamente para a progressão do CP e o prognóstico dos pacientes, sugerindo que o TIMP3 pode ser um marcador de prognóstico útil. O papel do TIMP3 na progressão do CP pode ser explicado pela ausência do controle de inibição endógena da expressão de metaloproteinases no tecido tumoral. Esta desregulação é responsável pelo aumento da expressão de metaloproteinases e conseqüentemente, do potencial de invasão do câncer. Conforme observado em estudos anteriores, a expressão elevada de metaloproteinases no tecido tumoral está associada ao progresso e invasão de diversos tipos de câncer, em especial do câncer de pênis.

O nosso estudo tem como limitação a necessidade de um número maior de pacientes, prontuários preenchidos de forma completa e sem lacunas de dados clínicos e patológicos dos pacientes, bem como uma resposta fidedigna dos pacientes quando realizadas as perguntas presentes no questionário sociodemográfico, a fim de que possamos obter resultados verdadeiros e significativos.

Apesar dos esforços terapêuticos, não podemos perder de vista a necessidade de prevenir o CP, através da adesão 100% nas campanhas de vacinação para o HPV, adesão a higiene do membro com água e sabão, bem como a adesão às restantes medidas preventivas deste e de outros tipos de câncer (SOUZA et al., 2021).

CONCLUSÃO

O perfil dos pacientes com câncer de pênis é de homens acima de 60 anos de idade, procedentes do interior do maranhão, de baixa escolaridade, baixa renda, de fumantes e ex-fumantes, e que possuíam o vírus HPV presente. Quando analisado o grau de estadiamento TNM observou-se um predomínio de estágio tumoral II, caracterizando doença em avanço. A dificuldade de acesso a serviços de saúde especializados, bem como problemas socioeconômicos podem dificultar o diagnóstico precoce, porém fatores como a presença do HPV e alguns hábitos de vida danosos como fumar cigarro e beber bebidas alcoólicas podem aumentar a predisposição ao desenvolvimento de carcinoma peniano. Foi observado uma alta prevalência de infecção por HPV entre as amostras de carcinoma peniano, e dentre eles, os HPVs de alto risco oncogênico como o de subtipo 16 predominaram. Além disso, pacientes que apresentavam em associação o vírus HPV e a variável baixa escolaridade eram a maioria, corroborando a hipótese de que há uma estreita relação deste câncer com fatores socioeconômicos e validando a relação entre a alta frequência deste câncer observada no estado do Maranhão, provavelmente condicionada a extrema pobreza verificada principalmente no interior do estado. Apesar de não apresentar significância estatística na associação entre a presença de HPV na amostra e o tabagismo e etilismo, o resultado reforça dados na literatura de que o consumo do tabaco e do álcool são fatores de risco para o desenvolvimento e progresso do câncer de pênis. A prevenção do câncer peniano pode estar relacionada ao uso da camisinha em pacientes ainda não infectados pelo HPV, essa associação deve receber atenção por parte do profissional de saúde, pois o trabalho educativo pode contribuir para a diminuição do número de pacientes acometidos por este câncer. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de MMP2 e TIMPs em amostras tumorais e sadias, reforçando a necessidade de estudos adicionais para esclarecer o seu papel na carcinogênese peniana. É importante realçar que amostras de tumores HPV+ e HPV- apresentam níveis significativamente diferentes de TIMP3, sugerindo que estes dois tipos de câncer de pênis regulam de forma diferente a activação das metaloproteinases. Esta hipótese poderá ser futuramente estudada com recurso a modelos experimentais *in vitro*, investigando mais profundamente o papel do TIMP3 na biopatologia do CP.

REFERÊNCIAS

- ALEMANY, L.; CUBILLA, A.; HALEC, G.; KASAMATSU, E. *et al.* Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. **Eur Urol**, 69, n. 5, p. 953-961, 05 2016.
- AMĂLINEI, C.; CĂRUNTU, I. D.; GIUȘCĂ, S. E.; BĂLAN, R. A. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. **Rom J Morphol Embryol**, 51, n. 2, p. 215-228, 2010.
- BANSAL, A.; SINGH, M. P.; RAI, B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. **Int J Appl Basic Med Res**, 6, n. 2, p. 84-89, 2016 Apr-Jun 2016.
- BARRETO, J. E.; VELAZQUEZ, E. F.; AYALA, E.; TORRES, J. *et al.* Carcinoma cuniculatum: a distinctive variant of penile squamous cell carcinoma: report of 7 cases. **Am J Surg Pathol**, 31, n. 1, p. 71-75, Jan 2007.
- BLEEKER, M. C.; HEIDEMAN, D. A.; SNIJDERS, P. J.; HORENBLAS, S. *et al.* Penile cancer: epidemiology, pathogenesis and prevention. **World J Urol**, 27, n. 2, p. 141-150, Apr 2009.
- BRANCA, M.; CIOTTI, M.; GIORGI, C.; SANTINI, D. *et al.* Matrix metalloproteinase2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. **Anticancer Res**, 26, n. 2B, p. 1543-1556, 2006 Mar-Apr 2006.
- BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiol**, 40, n. 2, p. 80-85, Apr 2017.
- CAMPOS, R. S.; LOPES, A.; GUIMARÃES, G. C.; CARVALHO, A. L. *et al.* Ecadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology**, 67, n. 4, p. 797-802, Apr 2006.
- CAUWE, B.; OPDENAKKER, G. Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, 45, n. 5, p. 351-423, Oct 2010.
- CAÑETE-PORTILLO, S.; CLAVERO, O.; SANCHEZ, D. F.; SILVERO, A. *et al.* Medullary Carcinoma of the Penis: A Distinctive HPV-related Neoplasm: A Report of 12 Cases. **Am J Surg Pathol**, 41, n. 4, p. 535-540, Apr 2017.
- CHAUX, A.; REUTER, V.; LEZCANO, C.; VELAZQUEZ, E. *et al.* Autopsy findings in 14 patients with penile squamous cell carcinoma. **Int J Surg Pathol**, 19, n. 2, p. 164169, Apr 2011.
- CHAUX, A.; SOARES, F.; RODRÍGUEZ, I.; BARRETO, J. *et al.* Papillary squamous cell carcinoma, not otherwise specified (NOS) of the penis: clinicopathologic features,

differential diagnosis, and outcome of 35 cases. **Am J Surg Pathol**, 34, n. 2, p. 223-230, Feb 2010.

CHAUX, A.; TAMBOLI, P.; AYALA, A.; SOARES, F. *et al.* Warty-basaloid carcinoma: clinicopathological features of a distinctive penile neoplasm. Report of 45 cases. **Mod Pathol**, 23, n. 6, p. 896-904, Jun 2010.

CHAUX, A.; VELAZQUEZ, E. F.; ALGABA, F.; AYALA, G. *et al.* Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. **Urology**, 76, n. 2 Suppl 1, p. S7-S14, Aug 2010.

CHRISTODOULIDOU, M.; SAHDEV, V.; HOUSSEIN, S.; MUNEER, A. Epidemiology of penile cancer. **Curr Probl Cancer**, 39, n. 3, p. 126-136, 2015 May-Jun 2015.

CLARK, I. M.; SWINGLER, T. E.; SAMPIERI, C. L.; EDWARDS, D. R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Int J Biochem Cell Biol**, 40, n. 6-7, p. 1362-1378, 2008.

CLARK, P. E.; SPIESS, P. E.; AGARWAL, N.; BIAGIOLI, M. C. *et al.* Penile cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology. **J Natl Compr Canc Netw**, 11, n. 5, p. 594-615, May 01 2013.

COELHO, R. W. P.; PINHO, J. D.; MORENO, J. S.; GARBIS, D. V. E. O. *et al.* Penile cancer in Maranhão, Northeast Brazil: the highest incidence globally? **BMC Urol**, 18, n. 1, p. 50, May 29 2018.

COUTLÉE, F.; GRAVITT, P.; KORNEGAY, J.; HANKINS, C. *et al.* Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. **J Clin Microbiol**, 40, n. 3, p. 902-907, Mar 2002.

COUTO, T. C.; ARRUDA, R. M.; COUTO, M. C.; BARROS, F. D. Epidemiological study of penile cancer in Pernambuco: experience of two reference centers. **Int Braz J Urol**, 40, n. 6, p. 738-744, 2014 Nov-Dec 2014.

CUBILLA, A. L.; AYALA, M. T.; BARRETO, J. E.; BELLASAI, J. G. *et al.* Surface adenosquamous carcinoma of the penis. A report of three cases. **Am J Surg Pathol**, 20, n. 2, p. 156-160, Feb 1996.

CUBILLA, A. L.; LLOVERAS, B.; ALEMANY, L.; ALEJO, M. *et al.* Basaloid squamous cell carcinoma of the penis with papillary features: a clinicopathologic study of 12 cases. **Am J Surg Pathol**, 36, n. 6, p. 869-875, Jun 2012.

CUBILLA, A. L.; REUTER, V. E.; GREGOIRE, L.; AYALA, G. *et al.* Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. **Am J Surg Pathol**, 22, n. 6, p. 755-761, Jun 1998.

CUBILLA, A. L.; VELAZQUES, E. F.; REUTER, V. E.; OLIVA, E. *et al.* Warty (condylomatous) squamous cell carcinoma of the penis: a report of 11 cases and proposed classification of 'verruciform' penile tumors. **Am J Surg Pathol**, 24, n. 4, p. 505-512, Apr 2000.

CUBILLA, A. L.; VELAZQUEZ, E. F.; AMIN, M. B.; EPSTEIN, J. *et al.* The World Health Organisation 2016 classification of penile carcinomas: a review and update from the International Society of Urological Pathology expert-driven recommendations. **Histopathology**, 72, n. 6, p. 893-904, May 2018.

CUBILLA, A. L.; VELAZQUEZ, E. F.; YOUNG, R. H. Pseudohyperplastic squamous cell carcinoma of the penis associated with lichen sclerosis. An extremely welldifferentiated, nonverruciform neoplasm that preferentially affects the foreskin and is frequently misdiagnosed: a report of 10 cases of a distinctive clinicopathologic entity. **Am J Surg Pathol**, 28, n. 7, p. 895-900, Jul 2004.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 147, p. 1-73, 2017.

CUNHA, I. W.; GUIMARAES, G. C.; SOARES, F.; VELAZQUEZ, E. *et al.* Pseudoglandular (adenoid, acantholytic) penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic and outcome study of 7 patients. **Am J Surg Pathol**, 33, n. 4, p. 551-555, Apr 2009.

DISCACCIATI, M. G.; GIMENES, F.; PENNACCHI, P. C.; FAIÃO-FLORES, F. *et al.* MMP-9/RECK Imbalance: A Mechanism Associated with High-Grade Cervical Lesions and Genital Infection by Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 24, n. 10, p. 1539-1547, Oct 2015.

DOUGLAWI, A.; MASTERSON, T. A. Penile cancer epidemiology and risk factors: a contemporary review. **Curr Opin Urol**, 29, n. 2, p. 145-149, 03 2019.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Ann Surg Oncol**, 17, n. 6, p. 1471-1474, Jun 2010.

FAVORITO, L. A.; NARDI, A. C.; RONALSA, M.; ZEQUI, S. C. *et al.* Epidemiologic study on penile cancer in Brazil. **Int Braz J Urol**, 34, n. 5, p. 587-591; discussion 591-583, 2008 Sep-Oct 2008.

FETSCH, J. F.; DAVIS, C. J.; MIETTINEN, M.; SESTERHENN, I. A. Leiomyosarcoma of the penis: a clinicopathologic study of 14 cases with review of the literature and discussion of the differential diagnosis. **Am J Surg Pathol**, 28, n. 1, p. 115-125, 01 2004.

GALATI, L.; BRANCACCIO, R. N.; ROBITAILLE, A.; CUENIN, C. *et al.* Detection of human papillomaviruses in paired healthy skin and actinic keratosis by next generation sequencing. **Papillomavirus Res**, 9, p. 100196, 06 2020.

GONZALEZ-AVILA, G.; SOMMER, B.; MENDOZA-POSADA, D. A.; RAMOS, C. *et al.* Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, 137, p. 57-83, May 2019.

GREGOIRE, L.; CUBILLA, A. L.; REUTER, V. E.; HAAS, G. P. *et al.* Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of

penileinvasive squamous cell carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, 87, n. 22, p. 1705-1709, Nov 15 1995.

HADLER-OLSEN, E.; WINBERG, J. O.; UHLIN-HANSEN, L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumour Biol**, 34, n. 4, p. 2041-2051, Aug 2013.

HAKENBERG, O. W.; COMPÉRAT, E. M.; MINHAS, S.; NECCHI, A. *et al.* EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. **Eur Urol**, 67, n. 1, p. 142-150, Jan 2015.

HANZAWA, M.; SHINDOH, M.; HIGASHINO, F.; YASUDA, M. *et al.* Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. **Carcinogenesis**, 21, n. 6, p. 1079-1085, Jun 2000.

HAZARD, K.; KARLSSON, A.; ANDERSSON, K.; EKBERG, H. *et al.* Cutaneous human papillomaviruses persist on healthy skin. **J Invest Dermatol**, 127, n. 1, p. 116119, Jan 2007.

HEBNER, C.; BEGLIN, M.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus E6 proteins mediate resistance to interferon-induced growth arrest through inhibition of p53 acetylation. **J Virol**, 81, n. 23, p. 12740-12747, Dec 2007.

HEGDE, R. S.; BERNSTEIN, H. D. The surprising complexity of signal sequences. **Trends Biochem Sci**, 31, n. 10, p. 563-571, Oct 2006.

HELLER, D. S. Lesions and Neoplasms of the Penis: A Review. **J Low Genit Tract Dis**, 20, n. 1, p. 107-111, Jan 2016.

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Manipulation of the innate immune response by human papillomaviruses. **Virus Res**, 231, p. 34-40, 03 02 2017.

HÜBBERS, C. U.; AKGÜL, B. HPV and cancer of the oral cavity. **Virulence**, 6, n. 3, p. 244-248, 2015.

JACKSON, B. C.; NEBERT, D. W.; VASILIOU, V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. **Hum Genomics**, 4, n. 3, p. 194-201, Feb 2010.

JACOB-FERREIRA, A. L.; SCHULZ, R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. **Arch Biochem Biophys**, 540, n. 1-2, p. 82-93, Dec 2013.

KAEWPRAG, J.; UMNAJVIJIT, W.; NGAMKHAM, J.; PONGLIKITMONGKOL, M. HPV16 oncoproteins promote cervical cancer invasiveness by upregulating specific matrix metalloproteinases. **PLoS One**, 8, n. 8, p. e71611, 2013.

KIM, Y. S.; JOH, T. H. Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders. **Biomol Ther (Seoul)**, 20, n. 2, p. 133-143, Mar 2012.

KRAUS, F. T.; PEREZMESA, C. Verrucous carcinoma. Clinical and pathologic study of 105 cases involving oral cavity, larynx and genitalia. **Cancer**, 19, n. 1, p. 26-38, Jan 1966.

- KROL, J.; LOEDIGE, I.; FILIPOWICZ, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat Rev Genet**, 11, n. 9, p. 597-610, Sep 2010.
- KUASNE, H.; BARROS-FILHO, M. C.; BUSO-LOPES, A.; MARCHI, F. A. *et al.* Integrative miRNA and mRNA analysis in penile carcinomas reveals markers and pathways with potential clinical impact. **Oncotarget**, 8, n. 9, p. 15294-15306, Feb 28 2017.
- LAMBERT, E.; DASSÉ, E.; HAYE, B.; PETITFRÈRE, E. TIMPs as multifacial proteins. **Crit Rev Oncol Hematol**, 49, n. 3, p. 187-198, Mar 2004.
- LI, J.; WANG, H.; KE, H.; NI, S. MiR-129 regulates MMP9 to control metastasis of non-small cell lung cancer. **Tumour Biol**, 36, n. 8, p. 5785-5790, Aug 2015.
- LONGWORTH, M. S.; WILSON, R.; LAIMINS, L. A. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. **EMBO J**, 24, n. 10, p. 1821-1830, May 18 2005.
- LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. **Eur Respir J**, 38, n. 1, p. 191-208, Jul 2011.
- MEDEIROS-FONSECA, B.; CUBILLA, A.; BRITO, H.; MARTINS, T. *et al.* Experimental Models for Studying HPV-Positive and HPV-Negative Penile Cancer: New Tools for An Old Disease. **Cancers (Basel)**, 13, n. 3, Jan 26 2021.
- MIRGHANI, H.; AMEN, F.; MOREAU, F.; LACAU ST GUILY, J. Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? **Oral Oncol**, 51, n. 3, p. 229-236, Mar 2015.
- MISRA, S.; CHATURVEDI, A.; MISRA, N. C. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. **Lancet Oncol**, 5, n. 4, p. 240-247, Apr 2004.
- MITTAL, R.; PATEL, A. P.; DEBS, L. H.; NGUYEN, D. *et al.* Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. **J Cell Physiol**, 231, n. 12, p. 2599-2621, 12 2016.
- MORRIS, B. J.; GRAY, R. H.; CASTELLSAGUE, X.; BOSCH, F. X. *et al.* The Strong Protective Effect of Circumcision against Cancer of the Penis. **Adv Urol**, 2011, p. 812368, 2011.
- NAGASE, H.; ITOH, Y.; BINNER, S. Interaction of alpha 2-macroglobulin with matrix metalloproteinases and its use for identification of their active forms. **Ann N Y Acad Sci**, 732, p. 294-302, Sep 06 1994.
- NOËL, A.; JOST, M.; MAQUOI, E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface. **Semin Cell Dev Biol**, 19, n. 1, p. 52-60, Feb 2008.
- OKUNADE, K. S. Human papillomavirus and cervical cancer. **J Obstet Gynaecol**, 40, n. 5, p. 602-608, Jul 2020.

OVERALL, C. M.; KLEIFELD, O. Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, 6, n. 3, p. 227-239, 03 2006.

PLATE, K. H.; BREIER, G.; RISAU, W. Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. **Brain Pathol**, 4, n. 3, p. 207-218, Jul 1994.

QUARANTA, M.; DANIELE, A.; COVIELLO, M.; VENNERI, M. T. *et al.* MMP-2, MMP9, VEGF and CA 15.3 in breast cancer. **Anticancer Res**, 27, n. 5B, p. 3593-3600, 2007 Sep-Oct 2007.

REIS, A. A.; PAULA, L. B.; PAULA, A. A.; SADDI, V. A. *et al.* [Clinico-epidemiological aspects associated with penile cancer]. **Cien Saude Colet**, 15 Suppl 1, p. 1105-1111, Jun 2010.

RUBIN, M. A.; KLETER, B.; ZHOU, M.; AYALA, G. *et al.* Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. **Am J Pathol**, 159, n. 4, p. 1211-1218, Oct 2001.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 16, n. 3, p. 203222, Mar 2017.

SANCHEZ, D. F.; RODRIGUEZ, I. M.; PIRIS, A.; CAÑETE, S. *et al.* Clear Cell Carcinoma of the Penis: An HPV-related Variant of Squamous Cell Carcinoma: A Report of 3 Cases. **Am J Surg Pathol**, 40, n. 7, p. 917-922, 07 2016.

SANTOS, J. M. O.; PEIXOTO DA SILVA, S.; GIL DA COSTA, R. M.; MEDEIROS, R. The Emerging Role of MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs in Cancer Cachexia. **Cancers (Basel)**, 12, n. 4, Apr 19 2020.

SMOLA-HESS, S.; PAHNE, J.; MAUCH, C.; ZIGRINO, P. *et al.* Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. **J Gen Virol**, 86, n. Pt 5, p. 1291-1296, May 2005.

SOARES, F. A.; DA CUNHA, I. W.; GUIMARÃES, G. C.; NONOGAKI, S. *et al.* The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch**, 449, n. 6, p. 637-646, Dec 2006.

SOMERVILLE, R. P.; OBLANDER, S. A.; APTE, S. S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. **Genome Biol**, 4, n. 6, p. 216, 2003.

SPIESS, P. E.; DHILLON, J.; BAUMGARTEN, A. S.; JOHNSTONE, P. A. *et al.* Pathophysiological basis of human papillomavirus in penile cancer: Key to prevention and delivery of more effective therapies. **CA Cancer J Clin**, 66, n. 6, p. 481-495, Nov 12 2016.

SRINIVAS, V.; MORSE, M. J.; HERR, H. W.; SOGANI, P. C. *et al.* Penile cancer: relation of extent of nodal metastasis to survival. **J Urol**, 137, n. 5, p. 880-882, May 1987.

StatPearls. *In*, 2022.

STEENBERGEN, R. D.; SNIJDERS, P. J.; HEIDEMAN, D. A.; MEIJER, C. J. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. **Nat Rev Cancer**, 14, n. 6, p. 395-405, Jun 2014.

STETLER-STEVENSON, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Sci Signal**, 1, n. 27, p. re6, Jul 08 2008.

STRATTON, K. L.; CULKIN, D. J. A Contemporary Review of HPV and Penile Cancer. **Oncology (Williston Park)**, 30, n. 3, p. 245-249, Mar 2016.

SZYMONOWICZ, K. A.; CHEN, J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer Biol Med**, 17, n. 4, p. 864-878, 11 15 2020.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochim Biophys Acta**, 1803, n. 1, p. 20-28, Jan 2010.

VELAZQUEZ, E. F.; MELAMED, J.; BARRETO, J. E.; AGUERO, F. *et al.* Sarcomatoid carcinoma of the penis: a clinicopathologic study of 15 cases. **Am J Surg Pathol**, 29, n. 9, p. 1152-1158, Sep 2005.

VIEIRA, C. B.; FEITOZA, L.; PINHO, J.; TEIXEIRA-JÚNIOR, A. *et al.* Profile of patients with penile cancer in the region with the highest worldwide incidence. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 2965, 02 19 2020.

WANG, H. Y.; TU, Y. S.; LONG, J.; ZHANG, H. Q. *et al.* SRF-miR-29b-MMP2 axis inhibits NSCLC invasion and metastasis. **Int J Oncol**, 47, n. 2, p. 641-649, Aug 2015.
WANICK, F. B.; TEICHNER, T. C.; SILVA, R.; MAGNANINI, M. M. *et al.* Squamous cell carcinoma of the penis: clinicopathologic study of 34 cases. **An Bras Dermatol**, 86, n. 6, p. 1082-1091, 2011 Nov-Dec 2011.

XU, T.; JING, C.; SHI, Y.; MIAO, R. *et al.* microRNA-20a enhances the epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by modulating matrix metalloproteinases. **Exp Ther Med**, 10, n. 2, p. 683-688, Aug 2015.

YADAV, L.; PURI, N.; RASTOGI, V.; SATPUTE, P. *et al.* Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. **Asian Pac J Cancer Prev**, 15, n. 3, p. 1085-1091, 2014.

YAN, C.; BOYD, D. D. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. **J Cell Physiol**, 211, n. 1, p. 19-26, Apr 2007.

ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Banco de Tumores e DNA do Maranhão

Universidade Federal do Maranhão.
Hospital Universitário
Banco de Tumores e DNA do Maranhão - HUUFMA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) para o armazenamento (guarda) do seu material biológico no Biobanco de Tumores do Maranhão, que poderá ser utilizado em pesquisas futuras. O motivo de estudarmos esse assunto é que muitas pessoas sofrem por causa desta doença, por isso faz-se necessário investigar sobre os fatores que facilitam seu desenvolvimento, novas possibilidades de diagnóstico e tratamentos melhores.

Se você aceitar participar com o armazenamento de seu material biológico neste Biobanco, parte do material retirado para seus exames de diagnóstico e/ou tratamento (tais como cirurgia, biópsia, coleta de sangue, etc) serão encaminhados e guardados no Biobanco de Tumores do Maranhão para as análises necessárias. É importante ressaltar que somente será guardado o material excedente, ou seja, aquele que sobrar dos procedimentos realizados pela instituição hospitalar responsável pelo seu diagnóstico e/ou tratamento, não sendo necessário que você seja submetido a outro procedimento para coleta do material.

A pesquisa apresenta um desconforto mínimo, pelo possível constrangimento em consentir parte de seu material biológico para ser analisado, não havendo riscos adicionais, pois o Biobanco ficará responsável apenas pelo armazenamento do material já coletado. Como direito seu destacamos a possibilidade de esclarecimento de suas dúvidas de acordo com seu questionamento. Você tem assegurado o direito a ressarcimento ou indenização no caso de quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa. Não haverá remuneração ou ajuda de custo (ressarcimento) pela sua participação e o Biobanco não intervirá em seu tratamento atual, contudo a pesquisa realizada por meio de sua concessão beneficiará de forma significativa o crescimento científico da área estudada, contribuindo para o desenvolvimento futuro de novos tratamentos.

A sua participação é voluntária, você poderá recusar ou sair da pesquisa em qualquer momento, bastando para isso, comunicar aos responsáveis pela investigação, sem prejuízo

algum para você. Caso você recuse ou decida retirar-se da pesquisa, o material será descartado conforme as normas da legislação sanitária.

Todas as informações coletadas serão estritamente confidenciais e utilizadas somente para fins de estudo. Os seus dados serão identificados em um código e, não, com o nome. Apenas os membros da pesquisa terão conhecimento dos dados, assegurando assim a sua privacidade. Os resultados deste estudo podem ser publicados, mas sua identificação não será revelada. Você tem o direito de conhecer os resultados obtidos com a utilização de seu material biológico, contatando a gerente do Biobanco pelo telefone abaixo.

Se você concordar, seu material poderá ser utilizado para pesquisas futuras, caso algum pesquisador com projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário – UFMA queira utilizar esse material. Pelo contrário, caso deseje, você poderá optar pela necessidade de ser contatado a cada novo projeto de pesquisa que utilize o material armazenado para permitir ou não a sua utilização. No final desse documento você poderá escolher umas dessas opções.

Sempre que tiver dúvidas ou necessitar de esclarecimentos sobre a pesquisa, você poderá contatar a Gerente do Biobanco de Tumores do Maranhão, Profa. Luciane Maria Oliveira Brito, pelo número (98) 2109-1000, ou sobre os aspectos éticos, contatar a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário, situado à Barão de Itapary, nº227, Centro ou pelo telefone (98) 2109-1242. Em caso de denúncias ou questões éticas relativas à pesquisa, o CEP também deverá ser contatado.

Se concordar em participar, você deverá assinar este termo de consentimento em duas vias e rubricar em todas as páginas juntamente com o pesquisador responsável. Uma cópia fica com você e a outra com o Pesquisador.

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento. Ficou claro que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo neste serviço.

() Caso necessário, as minhas amostras armazenadas no Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão podem ser utilizadas para pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário/UFMA.

() Desejo ser contatado para autorizar a utilização ou descarte das amostras cada vez que seja necessário e se no futuro não tiver condições de consentir na utilização ou descarte de meu material biológico armazenado, solicito que a autorização seja fornecida por algum familiar com contato prévio.

Nome do familiar:

Endereço:

Fone:

São Luís, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante

Pesquisador Responsável

Dados da Instituição Responsável pelo Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão- HU/UFMA. Unidade Presidente Dutra. Endereço: *Rua Barão de Itapary*, nº 227, Centro - São Luís-MA. CEP: 65020-070. E-mail: huufma@huufma.br. Fone: (98) 2109-1000.

Gerente do Biobanco de Tumores do Maranhão: Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito
Endereço: *Rua Coelho Neto*, nº311, Centro - São Luís - MA. CEP: 65020-560
Fone: (98) 2109-1273 / E-mail: btma@ufma.br

Endereço do CEP-HUUFMA: *Rua Barão de Itapary*, nº 227, Centro - São Luís-MA. CEP: 65020-070, Comitê de Ética em Pesquisa do HUUFMA, 4º andar. E-mail : cep@huufma.br fone: (98) 2109-1250

Endereço do CONEP- Conselho Nacional de Ética em Pesquisa- Conselho Nacional de Saúde - Esplanada dos Ministérios, Bloco "G" - Edifício Anexo, Ala "B" - 1º andar - Sala 103B - 70058-900 - Brasília, DF.

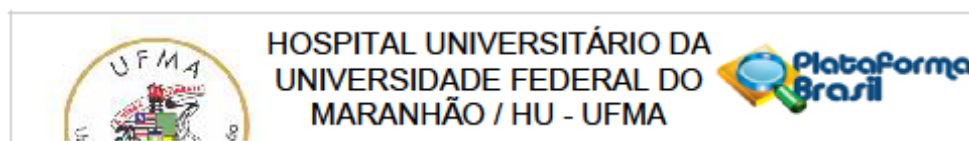
Anexo B – Questionário Sociodemográfico

Questionário Epidemiológico de Carcinoma Peniano

CARCINOMA PENIANO		FICHA DE REGISTRO
Nº do Prontuário:	Instituição: () HU UFMA () IMOAB () HG	
Nome do Paciente:		
IDENTIFICAÇÃO		
Cor: () branca () parda () preta () outra Raça: _____	Data de Coleta: ____/____/____	
Naturalidade:	Data de Nascimento: ____/____/____	
Residência:	Telefone: () _____	
Endereço:		
Estado Civil: () casado () solteiro () união consensual () viúvo () solteiro () divorciado		
Renda Familiar	Nível de Educação:	
1ª pessoa: ____ , ____	() Analfabeto () 1º grau () 2º grau () 3º grau	
2ª pessoa: ____ , ____	() Completo () Incompleto	
3ª pessoa: ____ , ____	Nº de cômodos na casa:	
4ª pessoa: ____ , ____	Água encanada na residência: () sim () não	
Renda Total: ____ , ____	Tratamento de esgoto: () sim () não	
HÁBITOS DE VIDA		
Tabagismo:	Etilismo:	Higiene da região genital:
() sim.	() sim.	() Não realiza
Tempo de tabagismo: _____	Frequência/sem: _____	() Água e sabão
() não	() não	() Expõe a glândula:
() Ex-Tabagista	() Ex-Etilista	() parcial
Há quanto tempo parou: _____	Há quanto tempo parou: _____	() total
() Passivo	Tipo: _____	
Tipo: _____	Doses/dia: _____	
Cigarros/dia: _____		
HÁBITOS SEXUAIS		
Idade da 1ª relação: ____	Atividade Sexual Atual: () Sim () Não	Nº de parceiros durante a vida:
Parceiros Fixos: () Sim () Não	Circuncisão: () sim () não	Idade da circuncisão:
Orientação Sexual: () Homossexual () Heterossexual () Bissexual () Zoofilia		
Já teve relação homossexual:	Penetração Anal: () Sim () Não	
Frequência do uso de camisinha:	Usou camisinha na última relação vaginal: () Sim () Não	
() nunca	Usou camisinha na última relação anal: () Sim () Não	
() às vezes	Usa camisinha com a parceira fixa: () Sim () Não	
() sempre	Usa camisinha com parceiras extraconjugais: () Sim () Não	
Lava-se após as relações sexuais: () sim () não	Higiene da região genital: () Sim () Não	

ANTECEDENTES MÓRBIDOS PESSOAIS E FAMILIARES		
Verrugas genitais: () sim () não		Idade de aparecimento:
HPV diagnosticado () não () sim, quando: _____		Tratamento: () não () sim, quando: _____
Parceira c/ HPV diagnóst. () não () sim, quando: _____		Tratamento: () não () sim, quando: _____
DST prévia: () não () sim		Idade de aparecimento: _____
Tipo de DST: () cancro mole () condiloma acuminado () gonorréia (esquentamento) () clamídia () herpes () linfogranuloma venéreo () sífilis () outras _____ Tratamento da(s) DST(s): () não () sim. Qual: _____		
Balanite: () não () sim Quando: _____	Trauma no pênis anteriormente: () não () sim Quando: _____	
Câncer prévio: () não () sim, Local: _____		
Câncer na família: () não () sim, Local: _____		Grau de parentesco: _____
HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL		
Data do aparecimento da lesão inicial: ____/____/____	Tipo de lesão inicial: () perda de pigmentação ou manchas esbranquiçadas () feridas e caroços no pênis () tumoração no pênis e/ou virilha () inflamações de longo período com vermelhidão e coceira () secreções e odor fétido	
Local do aparecimento da lesão inicial: () glândula () prepúcio () haste do pênis () base do pênis		
Auto conduta prévia: () não () sim, qual: _____		Evolução: () piora () melhora () inalterado
Tratamento prévio: () sim () não qual: _____		Evolução: () piora () melhora () inalterada
Procura ao centro de saúde: ____/____/____	Data do diagnóstico: ____/____/____	Tipo de atendimento: () público () privado
Estadiamento ao diagnóstico: _____		Grau histológico: _____
Tratamento: () Penectomia () Quimioterapia () Radioterapia () Outros: _____		
Data do início do tratamento: ____/____/____		Depressão: () sim () não
Recidiva: () Não () Local () Regional () À distância		Data da recidiva: ____/____/____
Entrevistador: _____		

Anexo C – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de metaloproteinases e seus inibidores endógenos em câncer de pênis: estudos clínico-patológico e a relação com a infecção pelo HPV

Pesquisador: Rui Miguel Gil da Costa Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47385321.0.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.790.696

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1690978.pdf 26/05/2021 07:26:10

Dentre as mais diversas patologias que afligem a população humana, o câncer ganha destaque pelo seu mecanismo fisiopatológico complexo, no qual diversas vias de sinalização estão envolvidas e para as quais temos direcionado nossa atuação em pesquisas buscando caminhos para diminuir a elevada incidência e as altas taxas de mortalidade associadas aos mais diversos tipos de tumores já identificados. Entre os vários tipos de câncer que temos catalogados, o câncer peniano faz parte dos tumores que acometem o sexo masculino. Constituindo uma doença rara, com estimativa de 22 mil casos por ano a nível mundial (ALEMANY et al., 2016). Apresenta maior incidência em países subdesenvolvidos, onde o câncer peniano pode ser responsável por até 10% dos cânceres entre homens em algumas partes da África, América do Sul e Ásia (ALEMANY et al., 2016). Este fato parece estar associado aos fatores etiológicos de desenvolvimento deste câncer que envolvem aspectos socioeconômicos: dentre eles a falta de higiene e comportamento sexual de risco (COELHO et al., 2018). No Brasil, a condição pode ser responsável por 2,1% de todas as neoplasias nos homens e afeta principalmente os habitantes das regiões Norte e Nordeste (COELHO et al., 2018). Nesse cenário o Maranhão se destaca como estado de maior incidência

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Anexo D – Financiamento

	ESTADO DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO		Processo UNIVERSAL-01285/17
	IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE		
NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br) LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003. ENDEREÇO: Rua Perdizes, nº 05, Qd 37, RESPONSÁVEL: Alex Oliveira de Souza BAIRRO / CEP: Jardim Renascença / 65075-340 CARGO: DIRETOR-PRESIDENTE			
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO			
NOME: LUCIANE MARIA OLIVEIRA BRITO CPF: 042.071.493-68 BANCO: Brasil INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO DEPARTAMENTO: BIOBANCO DE TUMORES DO ESTADO DO MARANHÃO ENDEREÇO: RUA DAS GARDÊNIAS 07 APTO 1002 TORRE ATHENA EDIFÍCIO MONTE OLIMPO CEP: 65077-440 ENDEREÇO ELETRÔNICO: luciane2406@yahoo.com.br IDENTIDADE: 0000799631973 Nº AGÊNCIA: 1878-3 Nº CONTA: 6.653-2 BAIRRO: PONTA DA ARÉIA CIDADE: SÃO LUÍS U.F.: MARANHÃO FONE FIXO: (98)32278238			
IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO			
SOLICITAÇÃO: UNIVERSAL-01285/17 MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL TÍTULO DO PROJETO: INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA INFECÇÃO POR HPV NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PÊNIS: ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS ÁREA / SUBÁREA : Ciências da Saúde / SAÚDE DO ADULTO VIGÊNCIA: 11/09/2017 a 11/09/2019 EDITAL: EDITAL FAPEMA Nº 31/2016 - UNIVERSAL			
VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO			
DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS	NÚMERO DE PARCELA(S)	VALOR TOTAL	
11/10/2019	02	R\$ 39.488,00	

TERMO: 015830/2017

ARTIGO

Human papillomavirus modulates matrix metalloproteinases during carcinogenesis: clinical significance and role of viral oncoproteins.

Flávia Mendonça¹, Amanda Mara Teles¹, Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento¹, Ana Paula Azevedo dos Santos^{1,2}, Fernanda Ferreira Lopes^{1,3}, Anselmo Paiva⁴, Haissa O. Brito^{1,5#}, Rui Gil da Costa^{1,5,6,7,8,#}

¹Post-graduate Programme in Adult Health (PPGSAD), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil;

²Post-graduate Programme in Health Sciences (PPGCS), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil;

³Post-graduate Programme in Odontology (PPGO), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil;

⁴Post-graduate Programme in Computational Science (PPGCO), Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil;

⁵Morphology Department, Federal University of Maranhão (UFMA), São Luís, Brazil;

⁶Molecular Oncology and Viral Pathology Group, Research Center of IPO Porto (CI-IPOP) / RISE@CI-IPOP, Portuguese Oncology Institute of Porto (IPO Porto) / Porto Comprehensive Cancer Center (Porto.CCC), Porto, Portugal;

⁷Centre for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITAB), Inov4Agro, University of Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

⁸LEPABE - Laboratory for Process Engineering, Environment, Biotechnology and Energy, Faculty of Engineering, University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

⁹ALiCE - Associate Laboratory in Chemical Engineering, Faculty of Engineering,
University of Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465 Porto, Portugal

Both authors contributed equally to this work.

*Correspondence:

Prof. Dr. Rui M. Gil da Costa, PPGSAD, Federal University of Maranhão

Avenida dos Portugueses, São Luís, Brazil; rui.costa@ufma.br; Tel.: +55-9132728000

Abstract

Background/Aim: Human papillomavirus (HPV) infections are associated with cervical cancer and other ano-genital cancers. Despite progresses in HPV vaccination and screening, these cancers still show high incidence and mortality, requiring improved prognostic markers and tailored therapies. This review addresses the role of MMPs in HPV-induced cancers and the modulation of MMP expression by HPV oncoproteins.

Materials and Methods: Scientific literature indexed in PubMed and Science Direct about Human papillomavirus modulates matrix metalloproteinases was retrieved and critically analyzed, to obtain an overview of expression patterns and their implications for carcinogenesis and patient prognosis.

Results: Matrix metalloproteinases (MMPs) such as MMP1, MMP9 and MMP13 have been associated with patient prognosis in HPV-induced cancers and play a major role in the degradation of the extracellular matrix, tumour invasion and metastasis. The HPV E2 and E7 oncoproteins regulate MMP expression via AKT, MEK/ERK and AP-1 signalling among other mechanisms.

Conclusion: Increased expression of MMPs is associated with cancer progression and poor prognosis in multiple HPV-induced cancers, suggesting their potential use as prognostic markers. The identification of specific signaling pathways that mediate MMP regulation by HPV is essential for developing efficient new cancer therapies.

Keywords: HPV, virus, oncoprotein, MMP, extracellular matrix, TIMP, ADAM.

Introduction

Human papillomavirus (HPV) includes more than 170 different types, some of which, known as high-risk HPV (most commonly HPV16 and HPV18), are associated with several types of cancer (1–3). Low-risk types are mainly involved in the pathogenesis of benign lesions (e.g. warts) of the skin and mucosae (4,5). HPV infection is common in sexually active people, is present in virtually all cases of uterine cervical carcinoma (CC) and, despite progress in HPV screening and vaccination, CC remains the third most common malignancy in women worldwide (6). High-risk HPV types are also associated with other ano-genital cancers (e.g. anal, penile, vulvar, vaginal cancers) and a growing subset of head-and-neck cancers (1). Due to this direct association between HPV and cancer, it is essential to clarify the mechanisms whereby HPV drives cellular transformation and invasion, in order to develop new prognostic and therapeutic biomarkers and therapeutic targets. Among these factors, matrix metalloproteinases (MMPs) play a critical role, especially with regard to the remodeling of the tumor microenvironment (TME), cell invasion and the development of metastatic disease. In fact, MMPs mediate multiple critical biological processes involved in the hallmarks of cancer, such as cell migration, differentiation, proliferation, apoptosis, inflammatory reactions, angiogenesis and platelet aggregation (7). Over the years, overexpression and/or high enzymatic activity of several MMPs has been correlated with increased aggressiveness of multiple malignancies, supporting the potential of MMPs as prognostic markers in cancer patients (8,9). Although direct therapeutic targeting of MMPs in cancer remains an unmet challenge, accumulating evidence suggests that the expression and activation of MMPs may be controlled using drugs that target upstream regulatory pathways. Now, in order to validate their potential as therapeutic targets and as biomarkers, it is essential to understand the cellular and extracellular regulatory mechanisms that control MMP expression and activation. More specifically, in the case of HPV-related malignancies, it is necessary to clarify how viral oncogenes and their

oncoprotein products contribute to up-regulate and activate MMPs, driving cancer progression. The present review aims to fill this knowledge gap by bringing together recent discoveries concerning the mechanisms through which HPV oncoproteins modulate MMP expression and activation, and identifying promising applications of MMPs as relevant cancer biomarkers or therapeutic targets.

For the present review article, a bibliographic search on Pubmed and Science Direct took place, searching for the following key words: human papillomaviruses, matrix metalloproteinases, cancer and MMP. Original articles posterior to 2010 were considered for analysis, while older works were only included if describing fundamental findings concerning HPV or MMPs. After the initial screening, the selected studies were read and texts were excluded if they did not meet the review proposal.

Matrix metalloproteinases

Matrix metalloproteinases are a family of zinc and calcium-dependent proteolytic enzymes that comprises metzincins, reprolysins, astacins, semalisins, meprines and adamalins (7,10–12). Most often, MMPs have been studied in the context of cancer due to their ability to disrupt molecules of the extracellular matrix including the basement membranes of epithelia (10). Additionally, MMPs are involved in the cleavage, activation and release of chemokines, cytokines, growth factors, adhesion molecules and cytoskeletal proteins and these functions allow them to participate in physiological processes such as inflammation, embryogenesis, wound healing, angiogenesis and tissue remodeling (13). MMPs can be classified according to their substrates as well as the organization of its structural domains into collagenases, gelatinases, stromelysins, matrilysins, membrane type (MT)-MMPs and other MMPs (11,12). Twenty-eight MMPs have been identified in vertebrates, of which 24 are present in humans. These include two equivalent forms of MMP-23 (MMP-23A and MMP-23B) encoded by 2 distinct genes on chromosome 1 (8). MMPs are numbered sequentially from MMP-1 to MMP-28

(12,14,15) and contain different domains whose molecular structures have been previously described (16,17). These are basically formed by: 1- a signal peptide that directs MMPs to secretory pathways except for membrane-type MMPs (MT-MMPs) (18), 2- an N-terminal propeptide (19), 3- a catalytic site that includes a zinc atom (20), 4- a hinge domain or ligand rich in proline residues (21) and 5- a region similar to C-terminal hemopexin that confers specificity of substrate or ligand (22), location and regulation of the enzymatic activity of MMPs as previously reviewed by (12). MMP regulation occurs in a tightly controlled manner to avoid tissue damage. Uncontrolled MMP proteolytic activity over the extracellular matrix (ECM) disrupts tissue homeostasis and is a prominent feature of a wide range of pathologies including rheumatoid arthritis, gastrointestinal ulcers, neuroinflammatory diseases, pulmonary emphysema and cancer (23).

Regulation of MMP expression and activity

The regulation of MMPs is controlled at several levels, including gene expression and translation, protein compartmentalization, proenzyme activation and enzyme inhibition. The regulation of gene expression is influenced by chemical agents, physical stress, oncogene products and growth factors, cytokines and cell-cell or cell-ECM interactions. Glucocorticoid hormones, retinoic acid and transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) also interfere in the expression of some MMPs (24). Regarding the regulation of gene expression, Yan and Boyd (2007) classified MMP-coding genes into three groups: the first group includes genes whose promoters have activating protein-1 (AP-1) binding sites and a TATA box, and comprise MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-19 and MMP-26 (25). Regulation of these promoters often involves the polyoma protein-3 enhancer (PEA-3), as well as cytokines and growth factors (26,27). The second group includes gene promoter regions containing only a TATA box and includes MMP-8, MMP-11 and MMP-21. Its gene expression regulation is

more flexible when compared to group 1 as previously reviewed (28). The third group displays multiple GC islands that bind to protein-1 (Sp1) and Sp3 transcription factors and include MMP-2, MMP-14 and MMP-28. Gene promoters in this group lack a TATA box (8). MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression post-transcriptionally (e.g. by binding to mRNAs and targeting them for degradation) and are critically involved in physiological and pathological processes such as cancer (29–32). The altered regulation of miRNAs is able to interfere with MMP expression, including in the context of cancer. An example was provided by Li *et al.* (2015) who observed that a decrease in miR-129 levels led to increased expression of MMP-9 in lung cancer tissues, promoting a more aggressive form of the disease (33). Wang *et al.* (2015) also reported that decreased miR-29b expression correlated with increased MMP-2 levels in lung cancer tissues and with presence of lymph node metastasis (34). Conversely, Xu *et al.* (2015) observed that the expression of microRNA-20a upregulated MMP-2 and MMP-9 by inhibiting the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) protein, thereby promoting epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer (35). Cell compartmentalization is another way of regulating MMPs, through which they are confined to specific cell compartments where they participate in the metabolism of a wide variety of intracellular components. MMP location is directly linked to signal peptide sequences that may, for example, prevent their translocation through the endoplasmic reticulum (36,37). The proenzymes in MMPs are inactive (except for MMP-23) because their pro-peptide domain has about eighty amino acids that, when forming a structure with a 40 Å sphere, prevent a substrate from binding (38), its activation occurs through the conformational change of the pro-peptide (11). Research carried out by Loffek *et al.* (2011), Kim and Joh, (2012) and Tallant *et al.* (2010) disclosed how MMPs are activated when their pro-peptide is autocatalytically removed, obtaining complete enzymatic activity (11,24,38). Active MMPs must be tightly regulated, because their unchecked enzymatic activity may interfere with tissue homeostasis. The

enzymatic activity of MMPs is controlled by two groups of endogenous inhibitors, α 2-macroglobulin (α 2M) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) (39). While α 2M is the main protease inhibitor in body fluids, TIMPs are specific regulators of MMPs enzyme activity in tissues (40). TIMPs are able to regulate cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, tumorigenesis and metastasis. The promotion or inhibition of these processes is highly context-dependent, varying with cell type, the TIMP molecule and its concentration. Interestingly, TIMPs have a variety of biological roles that appear to be independent from their enzyme inhibitory role, which fall outside of the scope of the present review (41).

MMPs in cancer

Recently, Gonzalez-Avila *et al.* (2019) drew clear associations between increased levels of one or more MMPs in body fluids, tissue samples and cancer progression (8). In fact, MMPs are involved in the acquisition of hallmarks of cancer such as inducing angiogenesis and activating invasion and metastasis, but also with tumor-promoting inflammation, a tumour-enabling characteristic (7,42). In multiple types of cancer, MMPs promote those cell and tissue processes through specific signaling pathways, which are summarized in Table 1. Of note, some MMPs promote multiple hallmarks of cancer or show multiple different functions in common types of cancer, including epithelial malignancies like breast and prostate cancers and melanoma.

Table 1. MMPs are associated with hallmarks of cancer in multiple types of cancer.

Tumor Type	MMPs	Signaling Route	Cancer hallmarks	References
Breast cancer	MMP-2 and MMP-9	Akt, STAT3 e MAPK	Invasion and angiogenesis	Bharti <i>et al.</i> (2018) (43)

Lung cancer	MMP-2			Chao <i>et al.</i>
	and	MAPK	Angiogenesis	(2019) (44)
Pancreatic cancer	MMP-9			
	MMP-1	AKT	Migration	Haang <i>et al.</i> (2018) (45)
Ovary cancer	MMP-2	p38 e		Lu <i>et al.</i>
	and	MAPK	Invasion	(2017) (46)
Nasopharynx	MMP-9			
	MMP-13	mTOR, RAFT	Migration and invasion	Shan <i>et al.</i> (2018) (47)
Gastric cancer	MMP-2			
	and	MAPK	Metastasis	Wang <i>et al.</i> (2019) (48)
Prostate cancer	MMP-9			
	MMP-7	PTEN/TP53	Invasion	Xie <i>et al.</i> (2016) (49)
Breast cancer	MMP-2		Proliferation,	
	and	PI3K/AKT	invasion and	Sun <i>et al.</i>
	MMP-9		metastasis	(2019) (50)
Melanoma	MMP-2		Proliferation,	
	and	PI3K/AKT	migration	Yao <i>et al.</i>
	MMP-9		and invasion	(2019) (25)
Ovarian cancer	MMP-9	NF-kB	Migration	Long <i>et al.</i>
			and invasion	(2012) (51)

MMP expression in HPV-induced cancers

The HPV genome includes a number of "early" genes, that are expressed soon after viral infection and are able to modify key cellular functions and 2 "late" genes that

encode capsid proteins. Among the protein products of early HPV genes are the E5, E6 and E7 oncoproteins, which are critical for cell transformation, as previously reviewed by our group and others, (52,53). The HPV oncoproteins are able to modulate the expression and activation of MMPs, which play critical roles in HPV-induced carcinogenesis, as detailed in the next two sections. HPV-induced cancers arise through a complex sequence of steps from precursor intraepithelial lesions (e.g. cervical intraepithelial neoplasms, CINs and penile intraepithelial neoplasms, PeIN). The development of invasive cancers from intraepithelial lesions is strongly dependent on the altered expression and distribution of MMPs (54). Sheu *et al.* (2003) and Nasr *et al.* (2005) observed high expression of MMP-2 in high-grade cervical lesions but not in normal cervix or in low-grade lesions, suggesting MMP2 may be useful a biomarker for cervical cancer and advanced pre-malignant lesions (55,56). According to Lu *et al.* (2011) and Kessenbrock *et al.* (2010), MMPs play a central role in the breakdown of the basement membrane and tumour cell invasion, as well as in neoangiogenesis and metastasis (57,58). These observations are in line with findings from other common malignancies, as discussed in previous sections. In line with those observations, Herbst *et al.* (2018) reported that the expression of MMP-2 and its tissue inhibitor regulating type 2 metalloproteinases (TIMP-2) are fundamental in the invasive behavior of cervical tumors and their metastatic potential (59). Branca *et al.* (2006) showed that MMP-2 expression levels were directly correlated with the degree of CIN (CIN1, 2 and 3), and were further increased in invasive cancer (60). However there was no change in the expression of TIMP-2 when compared to normal tissues, suggesting a progressive imbalance between MMP-2 and TIMP-2 levels likely to promote ECM degradation. The expression of MMP-9 has also been described in cervical squamous cell carcinoma and in CIN 2-3 samples (61). The authors observed that MMP-9 expression was elevated when compared with normal samples. Zhou *et al.* (2002) analyzed the presence of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in normal cervix, CIN and cervical cancer samples using

immunohistochemistry and observed the overexpression of these ECM components that can play a fundamental role in the invasion of lymph nodes associated with cervical cancer and metastasis (62). The authors suggested that MMP-9 can be used as an early marker for the progression of cervical lesions towards invasive cancers. The potential use of MMPs as prognostic markers is highlighted by works showing that MMPs can be detected immunohistochemically in cervical smears and their expression correlates with lesion severity (63). Valdivia *et al.* (2011), also using cervical scrapes, found expression of MMP-11 and MMP-12 in low and high-grade squamous cervical lesions and cervical carcinomas, also noting that both markers were associated with the presence of HPV (64). These results suggest that increased expression of MMPs is an early event during the development of pre-neoplastic cervical lesions. Importantly, MMP expression can be assessed in cervical smears routinely used for screening which may facilitate its use as prognostic markers. Zhu *et al.* (2015) demonstrate that high-risk HPV-16 E6 and E7 oncoproteins promoted the expression of MMP-2 and 9 contributing to the migration of cervical cells (65). Kuasne *et al.* (2017) found that MMP-1 expression is a predictive marker for metastasis in lymph nodes in penile cancer via the PPARG, VEGF and EGFR pathways (66). In line with these findings, the receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitor imatinib was able to reduce the expression of MMP2 and MMP14 in a cervical cancer cell line in vitro, suggesting MMP upregulation in this context may be, at least, partly, mediated by RTKs (67). On the other hand, a similar effect was observed on two HPV-negative cell lines representing head and neck squamous cell carcinomas in the same study, suggesting that such regulatory mechanisms are not specific for HPV-related cancers but may be present in SCCs at large.

Other genitourinary malignancies associated with HPV include vulvar and penile cancers (1,68). In penile cancer, overexpression of MMP2 and MMP9 was associated with an invasive growth pattern (69). Importantly, the same team reported that elevated MMP9 immunoexpression in tumour tissues was an independent risk factor for disease

recurrence, highlighting its potential as a prognostic marker (70). However, the authors did not stratify penile lesions according to their HPV status (i.e., HPV-positive and HPV-negative cases), so it remains to be determined whether the overexpression of MMPs and their prognostic significance are related to HPV status or include all penile cancers. Recently, Huang *et al.* (2020) reported that MMPs 7, 9, 10, 12 and 13 are overexpressed in human penile cancer independently of their HPV status and in a mouse model of penile cancer driven by gene mutations commonly found in HPV-positive and HPV-negative patients, suggesting that those MMPs may be involved in the pathogenesis of this malignancy in both subgroups. Vulvar squamous cell carcinoma is another ano-genital malignancy associated with HPV (71). As observed for cervical cancer, MMP2, MMP9, MMP12 and MMP13 were increased in intraepithelial and invasive vulvar lesions compared with normal tissues (72–75). In this type of cancer, up-regulation of MMP2 and MMP9 in vivo was found to be dependent on signaling via the Ras homologue gene family member A (76). Lovastatin downregulated RhoA, MMP2 and MMP9 expression, suggesting a potential therapeutic application against vulvar cancer.

There is a growing subset of head and neck squamous cell carcinomas associated with HPV, particularly the high-risk type HPV16, which specifically targets oropharyngeal locations such as the tonsils and the tongue base (1,77). Lee and Kim (2013) detected high MMP2 immunoexpression in head and neck papillomas and SCC associated with HPV16 and HPV18, suggesting that MMP2 deregulation is an early event in head and neck viral carcinogenesis (78). Umbreit *et al.* (2014) described the expression of MMP2 and MMP14 in both HPV+ and HPV- HNSCC cell lines in vitro, suggesting that MMP deregulation is not specific for HPV+ HNSCC (79). Gupta *et al.* (2015) compared the expression of MMP9 in HPV+ and HPV- tongue cancer and found no significant differences (80). Indeed, Hauff *et al.* (2014), using data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) showed that MMPs 2 and 9 were expressed in HPV+ and HPV- lesions. However, the authors also showed that MMP overexpression correlated with

poor 5-years survival in HPV+ patients only, suggesting the roles played by these proteins are different in HPV+ and HPV- lesions (81). Interestingly, the same team reported the use of MMPs and a fluorescent MMP-cleavable peptide to detect xenografted tumours in mice using fluorescence imaging, and this approach may be useful in the context of HNSCC intraoperative margin assessment. More recently, Vento *et al.* (2017) also reported that MMP7 overexpression in HPV+ but not HPV- HNSCC was associated with increased rates of distant disease recurrence and reduced 5-years survival (82). Interestingly, the serum levels of TIMP-1 were associated with overall survival and disease-free survival of HPV+ but not HPV- HNSCC patients (83). Importantly, targeted therapies against histone deacetylase 6 and bromodomain-containing protein 4 effectively suppressed HNSCC metastases in pre-clinical models, by downregulating MMP-2 and MMP-9 (84). A wider DNA demethylation approach using 5-azacytidine obtained comparable results (85). All these observations concur to indicate that MMPs are regulated through specific mechanisms in HPV-induced cancers and contribute uniquely for cancer aggressiveness. Furthermore, MMPs and possibly also TIMPs may be useful prognostic biomarkers in HPV-induced cancers. New therapies exert their effects via MMP inhibition, although direct targeting of specific MMPs in the clinical oncology setting still remains an unmet challenge. In order to develop this prognostic and therapeutic potential of MMPs, it is essential to understand how HPV regulates their expression in neoplastic lesions.

MMP regulation by HPV oncoproteins

In general, neoplastic cells overexpress MMPs in response to the activation of oncogenes, inactivation of onco-suppressor proteins (such as p53 and pRb in HPV-related cancers), stimulation by growth factors or pro-inflammatory substances, the accumulation of reactive oxygen species and tumour-associated hypoxia (86–90). In the case of HPV-induced malignancies, HPV oncoproteins, most prominently E6 and E7,

play an important role in deregulating MMP expression and activation. As discussed in the previous section, HPV16 is associated with increased expression of specific MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14 (MT1-MMP) and MMP-15) during the progression of cervical cancer when compared to normal tissues (91–94). Conversely, Da Silva Cardeal *et al.* (2012) showed that the HPV16 E7 oncoprotein is associated with a decreased expression and reduced activation of the MMP inhibitor TIMP-2 in primary keratinocytes (92). Early research by Smola-Hess *et al.* (2005) showed that keratinocytes that express the E7 gene of high-risk cutaneous and mucous HPV types exhibit MT1-MMP upregulation (95). Later on, Kaewprag *et al.* (2013) analyzed the ability of HPV16 and HPV18 oncoproteins to regulate the expression of MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-11 and MMP-14 (MT1-MMP) using C33A cells (93). The authors observed an upregulation of the MMP-2 and MT1-MMP genes when cells expressed the HPV16 E6 and E7 oncoproteins and E6 and E7 silencing led to MMP-2 and MT1-MMP downregulation. The expression of genes encoding MMPs is largely controlled by transcription factors such as the Activating Protein-1 (AP-1), Specificity Protein-1 (Sp-1) and the nuclear kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), depending on cell types and their microenvironment (11,96–98). So, multiple teams directed their efforts towards understanding how the HPV oncoproteins are able to modulate those transcription factors, thereby modifying MMP expression. AKT is able to activate AP-1, Sp-1 and NF- κ B (99–101). Importantly, Basukala *et al.* (2019) observed that the activation of the AKT pathway in HPV18+ cells is directly involved in the increase of MMP expression. Interestingly, the HPV18 oncoprotein E7 was found to play a fundamental role in driving AKT signaling through its CKII phospho acceptor site (102). In fact, targeted mutation of the E7 CKII phospho acceptor site specifically reduced the expression of MMP1 and MMP13, but not MMP8 in mutant cells. Taken together, these findings suggest that AKT signaling induced by the E7 oncoprotein (Figure 1) is a major factor involved in the control of MMP expression. Furthermore, Muhlen *et al.* (2009)

found that the activation of MMP-9 expression is associated with the intracellular localization of the HPV-16 oncoprotein E2 (103). The authors suggested a nuclear protein-protein interaction (e.g. via ERK1/2-AP-1 signaling) or an E2 protein-DNA interaction as the possible underlying activation mechanisms (Figure 1). The same was observed in non-melanoma skin cancer (cutaneous squamous cell carcinoma, NMSC) by Akgul *et al.* (2011) (104). Beta HPVs like HPV8 have been proposed to play a role in some NMSCs, cooperating with ultraviolet radiation to transform epidermal keratinocytes. Employing gel displacement analysis, Akgul *et al.* (2011) showed that the HPV8 E2 activates MMP9 expression and that this activation occurs through the binding of HPV8 E2 to a DNA sequence element containing a consensus E2 binding site within the MMP9 promoter, further supporting the discovery that E2 functions as an activator of MMP9 expression occurring via the MAPK/ERK/AP1 pathway (104).

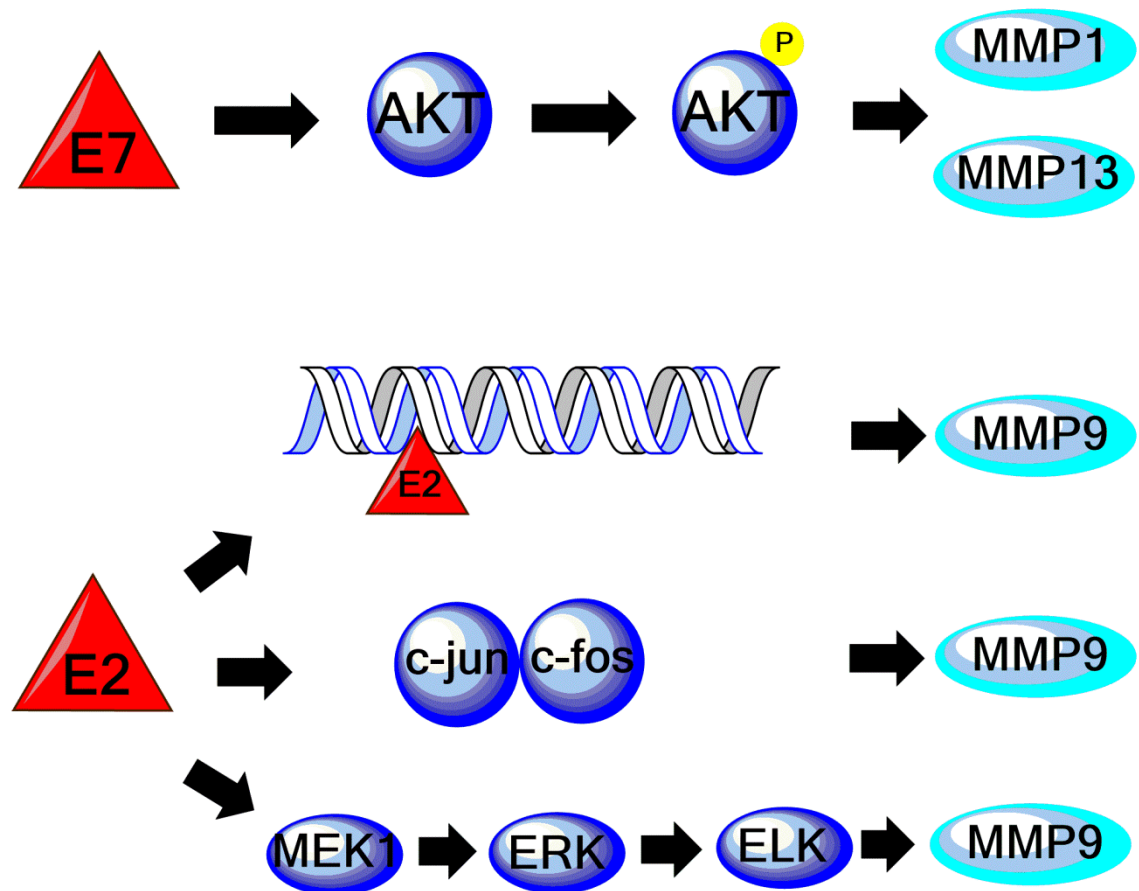


Figure 1. The E2 and E7 oncoproteins of HPV modulate metalloproteinase expression via direct protein-DNA interactions, as well as via AKT, MEK/ERK and AP-1 (through subunits c-jun and c-fos) signalling.

Interestingly, the HPV oncoproteins are also able to activate NF- κ B signaling in multiple ways, as previously reviewed (105), which may contribute for increased MMP expression. HPV16 E6 is able to activate NF- κ B by downregulating two of its inhibitors, the cylindromatosis (CYLD) protein (106) and the nuclear transcription factor X-box binding 1 (NFX1) (107). The HPV16 E5 oncoprotein was also suggested to upregulate cyclooxygenase-2 (COX-2) expression via NF- κ B and, to a lesser extent, AP-1 (108). The E2 protein of multiple HPV genera was also suggested to enhance the effects of tumour necrosis factor alpha on NF- κ B activation (109).

Conclusions

This research addressed the increased expression of cancer-induced MMPs and their overexpression in HPV, demonstrating that in certain signaling pathways MMPs can be increased due to their interaction with growth factors, inhibitory proteins and the EMT process, pathway silencing or of oncogenes. Verifying that the expression of MMPs is positively regulated in tumor tissues in primary cancer. It may be responsible for proliferation, migration, invasion and metastasis. In its expression significantly increased a worse prognosis when talking about cancer.

Conflicts of Interest

The Authors declare that they have no conflicts of interest.

Authors' Contributions

F Mendonça and AM Teles: article research, manuscript writing and submission; MDSB Nascimento, APA Santos, FF Lopes A Paiva and HO Brito: manuscript editing and review; RMG da Costa: article research, manuscript writing and drawing figures; manuscript review.

Funding

This study was supported by CAPES - finance code 001 (13/2020 - PDPG Amazônia Legal 0810/2020/88881.510244/2020-01), grant IECT-FAPEMA-05796/18 and FAPEMA IECT 30/2018 - IECT Saúde, by the Research Center of the Portuguese Oncology Institute of Porto (project no. PI86-CI-IPOP-66-2017); by European Investment Funds by FEDER/COMPETE/POCI - Operational Competitiveness and Internationalization Program, and national funds by FCT - Portuguese Foundation for Science and Technology under projects UID/AGR/04033/2020, UIDB/CVT/00772/2020 and This work was financially supported by LA/P/0045/2020 (ALiCE), UIDB/00511/2020 and UIDP/00511/2020 (LEPABE), funded by national funds through FCT/MCTES (PIDDAC). Amanda Teles was supported by a CAPES postdoctoral grant under project PDPG Amazônia Legal 0810/2020/88881.510244/2020-01.

REFERENCES

1. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017;141(4):664–70.
2. Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quirós B, Masferrer E, et al. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *Eur Urol*. 2016;69(5):953–61.
3. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013;445(1–2):2–10.
4. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 2006;110(5):525–41.

5. Lopez-Charcas O, Espinosa AM, Alfaro A, Herrera-Carrillo Z, Ramirez-Cordero BE, Cortes-Reynosa P, et al. The invasiveness of human cervical cancer associated to the function of NaV1.6 channels is mediated by MMP-2 activity. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–16.
6. Barillari G, Monini P, Sgadari C, Ensoli B. The impact of human papilloma viruses, matrix metallo-proteinases and HIV protease inhibitors on the onset and progression of uterine cervix epithelial tumors: A review of preclinical and clinical studies. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5).
7. Hadler-Olsen E, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Matrix metalloproteinases in cancer: Their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumor Biol*. 2013;34(4):2041–51.
8. Gonzalez-Avila G, Sommer B, Mendoza-Posada DA, Ramos C, Garcia-Hernandez AA, Falfan-Valencia R. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2019;137(February):57–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.02.010>
9. Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. Matrix metalloproteinases and cancer - Roles in threat and therapy. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2014;15(3):1085–91.
10. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* [Internet]. 2009;29(5):290–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
11. Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease” edited by J. Müller-Quernheim and O. Eickelberg number 1 in this series: Biological role of matrix metalloproteinases: A critical balance. *Eur Respir J*. 2011;38(1):191–208.
12. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases [Internet]. 1st ed. Vol. 147, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2017. 1–73 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.02.005>
13. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The roles of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):1–53.
14. Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. *Hum Genomics*. 2010;4(3):194–201.
15. Mittal R, Patel AP, Debs LH, Nguyen D, Patel K, Grati M, et al. Intricate Functions

- of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. *J Cell Physiol.* 2016;231(12):2599–621.
16. Roeb E, Schleinkofer K, Kernebeck T, Pötsch S, Jansen B, Behrmann I, et al. The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem.* 2002;277(52):50326–32.
 17. Somerville RPT, Oblander SA, Apte SS, Foundation CC, Avenue E. MMP 2003.pdf. 2003;
 18. Sato H, Kinoshita T, Takino T, Nakayama K, Seiki M. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett.* 1996;393(1):101–4.
 19. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(14):5578–82.
 20. Bode W, Grams F, Reinemer P, Gomis-Rüth FX, Baumann U, McKay DB, et al. The metzincin-superfamily of zinc-peptidases. *Adv Exp Med Biol.* 1996;389:1–11.
 21. Velasco G, Pendás AM, Fueyo A, Knäuper V, Murphy G, López-Otín C. Cloning and characterization of human MMP-23, a new matrix metalloproteinase predominantly expressed in reproductive tissues and lacking conserved domains in other family members. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4570–6.
 22. Rozanov D V., Ghebrehiwet B, Postnova TI, Eichinger A, Deryugina EI, Strongin AY. The hemopexin-like C-terminal domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates proteolysis of a multifunctional protein, gC1qR. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(11):9318–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110711200>
 23. Amălinei C, Căruntu ID, Giuță SE, Bălan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(2):215–28.
 24. Kim YS, Joh TH. Matrix metalloproteinases, new insights into the understanding of neurodegenerative disorders. *Biomol Ther.* 2012;20(2):133–43.
 25. Yan, C., & Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2006;211(3)(May):736–47.
 26. Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about? *Matrix Biol.* 1997;15(8–9):519–26.
 27. Fini ME, Cook JR, Mohan R BC. Regulation of matrix metalloproteinases gene expression. Academic. Parks WC MR, editor. New York; 1988. 299–359 p.
 28. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix

- metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(6–7):1362–78.
29. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):597–610.
 30. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(3):203–21.
 31. Santos JMO, da Silva SP, Costa NR, Gil da Costa RM, Medeiros R. The role of microRNAs in the metastatic process of high-risk HPV-induced cancers. *Cancers (Basel).* 2018;10(12):1–15.
 32. Santos JMO, Da Silva SP, Gil Da Costa RM, Medeiros R. The emerging role of micrnas and other non-coding rnas in cancer cachexia. *Cancers (Basel).* 2020;12(4):1–14.
 33. Li C, Li Y, Sui L, Wang J, Li F. Phenyllactic acid promotes cell migration and invasion in cervical cancer via IKK/NF- κ B-mediated MMP-9 activation. *Cancer Cell Int [Internet].* 2019;19(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0965-0>
 34. Wang HY, Tu YS, Long J, Zhang HQ, Qi CL, Xie X Bin, et al. SRF-miR-29b-MMP2 axis inhibits NSCLC invasion and metastasis. *Int J Oncol.* 2015;47(2):641–9.
 35. Xu T, Jing C, Shi Y, Miao R, Peng L, Kong S, et al. microRNA-20a enhances the epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cells by modulating matrix metalloproteinases. *Exp Ther Med.* 2015;10(2):683–8.
 36. Hegde RS, Bernstein HD. The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(10):563–71.
 37. Cauwe B, Opdenakker G. Intracellular substrate cleavage: A novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2010;45(5):351–423.
 38. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res [Internet].* 2010;1803(1):20–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.003>
 39. NAGASE H, ITOH Y, BINNER S. Interaction of α 2-Macroglobulin with Matrix Metalloproteinases and Its Use for Identification of Their Active Forms. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732(1):294–302.
 40. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;49(3):187–98.

41. Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: Metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal*. 2008;1(27).
42. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
43. Bharti R, Dey G, Das AK, Mandal M. Differential expression of IL-6/IL-6R and MAO-A regulates invasion/angiogenesis in breast cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2018;118(11):1442–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-018-0078-x>
44. Chao W, Deng JS, Li PY, Kuo YH, Huang GJ. Inotilone from *Inonotus linteus* suppresses lung cancer metastasis in vitro and in vivo through ROS-mediated PI3K/AKT/MAPK signaling pathways. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
45. Jeung H, Vollmann M, Herpertz SC, Schwierien C. Consider others better than yourself: Social decision-making and partner preference in Borderline Personality Disorder. *J Behav Ther Exp Psychiatry* [Internet]. 2020;67(July):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbtep.2018.11.004>
46. Lu J, Wang SL, Wang YC, Wu YN, Yu X, Zhao WZ, et al. High WAVE3 expression correlates with proliferation, migration and invasion in human ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8(25):41189–201.
47. Shan Y, You B, Shi S, Shi W, Zhang Z, Zhang Q, et al. Hypoxia-Induced Matrix Metalloproteinase-13 Expression in Exosomes from Nasopharyngeal Carcinoma Enhances Metastases. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018;9(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0425-0>
48. Wang X, Wang B, Zhan W, Kang L, Zhang S, Chen C, et al. Melatonin inhibits lung metastasis of gastric cancer in vivo. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2019;117(May):109018. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109018>
49. Xie Y, Lu W, Liu S, Yang Q, Shawn Goodwin J, Sathyanarayana SA, et al. MMP7 interacts with ARF in nucleus to potentiate tumor microenvironments for prostate cancer progression in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(30):47609–19.
50. Sun Y, Zhou QM, Lu YY, Zhang H, Chen QL, Zhao M, et al. Resveratrol inhibits the migration and metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecules*. 2019;24(6):1–16.
51. Long H, Xie R, Xiang T, Zhao Z, Lin S, Liang Z, et al. Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133 + ovarian cancer stem-like cells via NF- κ B-mediated MMP-9 upregulation. *Stem Cells*. 2012;30(10):2309–19.

52. Estêvão D, Costa NR, Gil da Costa RM, Medeiros R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* [Internet]. 2019;1862(2):153–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.01.001>
53. Srishti Vashisht, Harshita Mishra, Pawan K. Mishra AE and ST. Structure, Genome, Infection Cycle and Clinical Manifestations Associated with Human Papillomavirus. *Curr Pharm Biotechnol*. 2019;20(15):1260–80.
54. Steenbergen RDM, Snijders PJF, Heideman DAM, Meijer CJLM. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014;14(6):395–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3728>
55. Bor-Ching Sheu, Huang-Chun Lien, Hong-Nerng Ho, Ho-Hsiung Lin, Song-Nan Chow, Su-Cheng Huang S-MH. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. *Cancer Res*. 2003;63(19):6537–6542.
56. Nasr M, Ayyad SB, El-Lamie IK MM. Expression of matrix metalloproteinase-2 in preinvasive and invasive carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005;26(2):199–202.
57. Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(12):1–24.
58. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52–67.
59. Herbst S, Paladino A, de Freitas S, Boccardo E. Alterations in the expression and activity of extracellular matrix components in HPV-associated infections and diseases. *Clinics*. 2018;73:1–7.
60. Branca M, Ciotti M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Costa S, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its tissue inhibitor (TIMP-2) are prognostic factors in cervical cancer, related to invasive disease but not to high-risk human papillomavirus (HPV) or virus persistence after treatment of CIN. *Anticancer Res*. 2006;26(2 B):1543–56.
61. Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, Lerner-Geva L, Gotlieb WH, Weis B, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix - Clinicopathologic study using immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization. *Gynecol Oncol*. 1999;72(3):380–6.
62. Zhou CY, Yao JF CX. [Expression of matrix metalloproteinase-2, 9 and their

- inhibitor-TIMP 1,2 in human squamous cell carcinoma of uterine cervix]. *Ai Zheng*. 21(7):735–9.
63. Matheus ER, Zonta MA, Discacciati MG, Paruci P, Velame F, Cardeal LB, Barros SB, Pignatari AC M-ES. MMP-9 Expression Increases According to the Grade of Squamous Intraepithelial Lesion in Cervical Smears. *Diagn Cytopathol*. 42(10):827–33.
 64. Valdivia A, Peralta R, Matute-González M, Cebada JMG, Casasola I, Jiménez-Medrano C, et al. Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(7):674–82.
 65. Zhu D, Ye M, Zhang W. E6/E7 oncoproteins of high risk HPV-16 upregulate MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 and promote the migration of cervical cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):4981–9.
 66. Kuasne H, Barros-Filho MC, Busso-Lopes A, Marchi FA, Pinheiro M, Muñoz JJM, et al. Integrative miRNA and mRNA analysis in penile carcinomas reveals markers and pathways with potential clinical impact. *Oncotarget*. 2017;8(9):15294–306.
 67. Faber A, Sauter A, Hoedt S, Hoermann K, Erben P, Hofheinz RD, et al. Alteration of MMP-2 and -14 expression by imatinib in HPV-positive and -negative squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2012;28(1):172–8.
 68. Medeiros-Fonseca B, Mestre VF, Estêvão D, Sánchez DF, Cañete-Portillo S, Fernández-Nestosa MJ, et al. HPV16 induces penile intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma in transgenic mice: first mouse model for HPV-related penile cancer. *J Pathol*. 2020;251(4):411–9.
 69. Soares FA, Da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RSM, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. *Virchows Arch*. 2006;449(6):637–46.
 70. Sousa Madeira Campos R, Lopes A, Cardoso Guimarães G, Lopes Carvalho A, Augusto Soares F. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: Analysis of 125 patients. *Urology*. 2006;67(4):797–802.
 71. Huang T, Cheng X, Chahoud J, Sarhan A, Tamboli P, Rao P, et al. Effective combinatorial immunotherapy for penile squamous cell carcinoma. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15980-9>
 72. Johansson N, Vaalamo M, Grénman S, Hietanen S, Klemi P, Saarialho-Kere U, et al. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar

- squamous cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1999;154(2):469–80.
73. Kerkelä E, Ala-aho R, Klemi P, Grénman S, Shapiro SD, Kähäri VM, et al. Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *J Pathol.* 2002;198(2):258–69.
 74. Bovo AC, Guerreiro Da Silva IDC, Takita LC, Fochi J, Stávale JN, Marks G, et al. A comparative study of MMP-2 in vulvar neoplasms. *Gynecol Oncol.* 2004;93(2):454–7.
 75. Määttä M, Santala M, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Talvensaari-Mattila A. Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 2 expression is associated with progression from vulvar intraepithelial neoplasia to invasive carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010;89(3):380–4.
 76. Wang J, Wu Q, Zhang L hua, Zhao Y xia, Wu X. The role of RhoA in vulvar squamous cell carcinoma: a carcinogenesis, progression, and target therapy marker. *Tumor Biol.* 2016;37(3):2879–90.
 77. Mestre VF, Medeiros-Fonseca B, Estêvão D, Casaca F, Silva S, Félix A, et al. HPV16 is sufficient to induce squamous cell carcinoma specifically in the tongue base in transgenic mice. *J Pathol.* 2020;251(1):4–11.
 78. Lee H-J, Kim J-W. Immunohistochemical study on the expression of matrix metalloproteinase 2 and high-risk human papilloma virus in the malignant progression of papillomas. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2013;39(5):224.
 79. Umbreit C, Aderhold C, Faber A, Sauter A, Hofheinz RD, Stern-Straeter J, et al. Imatinib-associated matrix metalloproteinase suppression in p16-positive squamous cell carcinoma compared to HPV-negative HNSCC cells in vitro. *Oncol Rep.* 2014;32(2):668–76.
 80. Gupta S, Kumar P, Kaur H, Sharma N, Saluja D, Bharti AC, et al. Selective participation of c-Jun with Fra-2/c-Fos promotes aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in tongue cancer. *Sci Rep [Internet].* 2015;5(April):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep16811>
 81. Hauff SJ, Raju SC, Orosco RK, Gross AM, Diaz-Perez JA, Savariar E, et al. Matrix-metalloproteinases in head and neck carcinoma-cancer genome atlas analysis and fluorescence imaging in mice. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States).* 2014;151(4):612–8.
 82. Vento SI, Jouhi L, Mohamed H, Haglund C, Mäkitie AA, Atula T, et al. MMP-7 expression may influence the rate of distant recurrences and disease-specific

- survival in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 2018;472(6):975–81.
83. Carpén T, Sorsa T, Jouhi L, Tervahartiala T, Haglund C, Syrjänen S, et al. High levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in the serum are associated with poor prognosis in HPV-negative squamous cell oropharyngeal cancer. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2019;68(8):1263–72. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02362-4>
 84. Cho HY, Lee SW, Jeon YH, Lee DH, Kim GW, Yoo J, et al. Combination of acy-241 and jq1 synergistically suppresses metastasis of hnscc via regulation of mmp-2 and mmp-9. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):1–17.
 85. Biktasova A, Hajek M, Sewell A, Gary C, Bellinger G, Deshpande HA, et al. Demethylation therapy as a targeted treatment for human papillomavirus-associated head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(23):7276–87.
 86. Hanzawa M, Shindoh M, Higashino F, Yasuda M, Inoue N, Hida K, Ono M, Kohgo T, Nakamura M, Notani K, Fukuda H, Totsuka Y, Yoshida K FK. Hepatocyte growth factor upregulates E1AF that induces oral squamous cell carcinoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase genes. *Carcinogenesis*. 2000;21(6):1079–85.
 87. Jacob-Ferreira AL, Schulz R. Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2013;540(1–2):82–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.09.019>
 88. Tang YL, Liu X, Gao SY, Feng H, Jiang YP, Wang SS, et al. WIP1 stimulates migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing MMP-9 and VEGF-C. *Oncotarget*. 2015;6(11):9031–44.
 89. Shin DH, Dier U, Melendez JA, Hempel N. Regulation of MMP-1 expression in response to hypoxia is dependent on the intracellular redox status of metastatic bladder cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2015;1852(12):2593–602. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.001>
 90. Zong L, Li J, Chen X, Chen K, Li W, Li X, et al. Lipoxin A4 Attenuates Cell Invasion by Inhibiting ROS/ERK/MMP Pathway in Pancreatic Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016.
 91. Da Silva Cardeal LB, Brohem CA, Corrêa TCS, Winnischofer SMB, Nakano F, Boccardo E, et al. Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence. *Biochem Cell Biol*.

- 2006;84(5):713–9.
92. da Silva Cardeal LB, Boccardo E, Termini L, Rabachini T, Andreoli MA, di Loreto C, et al. HPV16 oncoproteins induce MMPs/RECK-TIMP-2 imbalance in primary keratinocytes: Possible implications in cervical carcinogenesis. *PLoS One*. 2012;7(3):1–9.
 93. Kaewprag J, Umnajvitt W, Ngamkham J, Ponglikitmongkol M. HPV16 Oncoproteins Promote Cervical Cancer Invasiveness by Upregulating Specific Matrix Metalloproteinases. *PLoS One*. 2013;8(8):1–11.
 94. Discacciati MG, Gimenes F, Pennacchi PC, Faião-Flores F, Zeferino LC, Derchain SM, et al. MMP-9/RECK imbalance: A mechanism associated with high-grade cervical lesions and genital infection by human papillomavirus and chlamydia trachomatis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2015;24(10):1539–47.
 95. Smola-Hess S, Pahne J, Mauch C, Zigrino P, Smola H, Pfister HJ. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: Role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J Gen Virol*. 2005;86(5):1291–6.
 96. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: Integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res*. 2002;4(3):157–64.
 97. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids*. 2011;41(2):271–90.
 98. Rohani MG, Parks WC. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol* [Internet]. 2015;44–46:113–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.002>
 99. Liu D, Zhang R, Wu J, Pu Y, Yin X, Cheng Y, et al. Interleukin-17A promotes esophageal adenocarcinoma cell invasiveness through ROS-dependent, NF-κB-mediated MMP-2/9 activation. *Oncol Rep*. 2017;37(3):1779–85.
 100. Adisheshaiah P, Vaz M, Machireddy N, Kalvakolanu D V., Reddy SP. A Fra-1-dependent, matrix metalloproteinase driven EGFR activation promotes human lung epithelial cell motility and invasion. *J Cell Physiol*. 2008;216(2):405–12.
 101. Zhang S, Wang Y, Gu Y, Zhu J, Ci C, Guo Z, et al. Specific breast cancer prognosis-subtype distinctions based on DNA methylation patterns. *Mol Oncol*. 2018;12(7):1047–60.
 102. Basukala O, Mittal S, Massimi P, Bestagno M, Banks L. The HPV-18 E7 CKII phospho acceptor site is required for maintaining the transformed phenotype of cervical tumour-derived cells. *PLoS Pathog*. 2019;15(5):1–23.

103. Mühlen S, Behren A, Iftner T, Plinkert PK, Simon C. AP-1 and ERK1 but not p38 nor JNK is required for CRPV early protein 2-dependent MMP-9 promoter activation in rabbit epithelial cells. *Virus Res.* 2009;139(1):100–5.
104. Akgül B, García-Escudero R, Ekechi C, Steger G, Navsaria H, Pfister H, et al. The E2 protein of human papillomavirus type 8 increases the expression of matrix metalloproteinase-9 in human keratinocytes and organotypic skin cultures. *Med Microbiol Immunol.* 2011;200(2):127–35.
105. Da Costa RMG, Bastos MMSM, Medeiros R, Oliveira PA. The NFκB signaling pathway in papillomavirus-induced lesions: Friend or foe? *Anticancer Res.* 2016;36(5):2073–83.
106. An J, Mo D, Liu H, Veena MS, Srivatsan ES, Massoumi R, et al. Inactivation of the CYLD Deubiquitinase by HPV E6 Mediates Hypoxia-Induced NF-κB Activation. *Cancer Cell* [Internet]. 2008;14(5):394–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2008.10.007>
107. Xu M, Katzenellenbogen RA, Grandori C, Galloway DA. NFX1 Plays a Role in Human Papillomavirus Type 16 E6 Activation of NFκB Activity. *J Virol.* 2010;84(21):11461–9.
108. Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhnn YS, Song YS. Involvement of NF-κB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis.* 2009;30(5):753–7.
109. Boulabiar M, Boubaker S, Favre M, Demeret C. Keratinocyte sensitization to tumour necrosis factor-induced nuclear factor kappa B activation by the E2 regulatory protein of human papillomaviruses. *J Gen Virol.* 2011;92(10):2422–7.

