
Expression of RECK and TIMP-2 Proteins and Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Cervical Lesions

Expressão das proteínas RECK e TIMP-2 e das Metaloproteínas de matriz 2 e 9 em lesões cervicais

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

Emmanuel Nóbrega Travassos de Arruda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9904-4913>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: emmanuel.nobrega@ufpe.br

Gabriel José Mattos Leão

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-5225-5661>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: gabriel.mattosleao@ufpe.br

Helbert Gean da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-2373-5162>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: helbert.gean@ufpe.br

Isa Cordeiro da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1334-2574>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: isa.cordeiros@ufpe.br

Julliano Matheus de Lima Maux

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5346-3525>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: julliano.maux@ufpe.br

Carlos Daniel Passos Lobo

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-9673-8805>

Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas, Brasil

E-mail: carlos.passos@uncisal.edu.br

Jacinto da Costa Silva Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4418-801X>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: jacinto.costa@ufpe.br

ABSTRACT

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

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

RESUMO

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

MÉTODOS

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

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

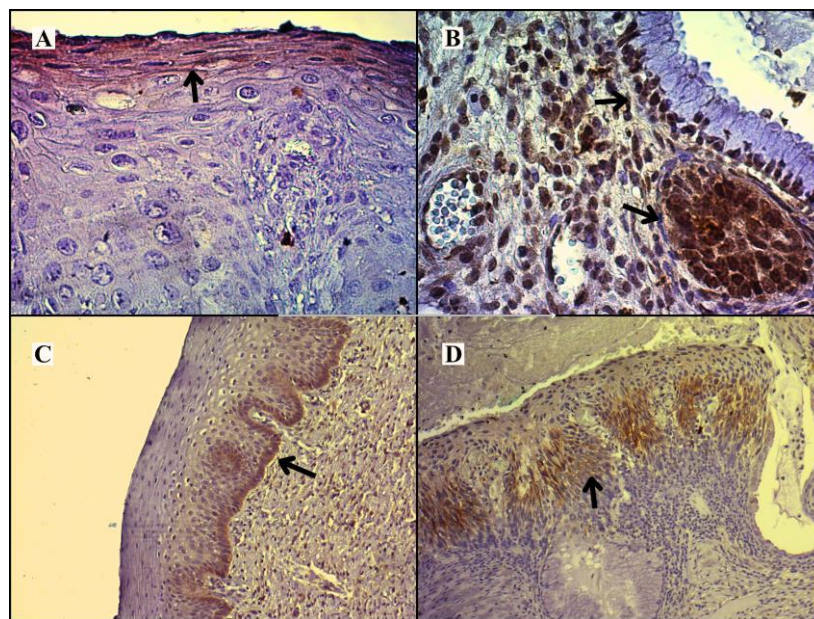
fragmentos de biópsias encaminhadas para análise histopatológica. O método utilizado foi o livre de biotina e conjugado com HRP. Foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo contra as proteínas MMP-2 e MMP-9 (*Santa Cruz Biotechnology* e diluição 1:400), TIMP-2 e RECK (*Santa Cruz Biotechnology*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

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

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

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

Figura 1 – Imunorreatividade em diferentes graus de lesão



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

RESULTADOS

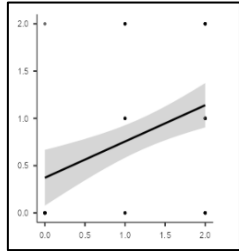
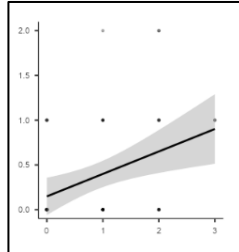
Inicialmente, foram analisados 240 prontuários, sendo selecionados aqueles que possuíam informações referentes ao laudo citopatológico, idade da primeira relação sexual (em média, 16 anos) e diagnóstico histopatológico. A idade média das pacientes à época do diagnóstico da lesão foi de 34,91 anos. No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

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

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

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

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

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

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

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

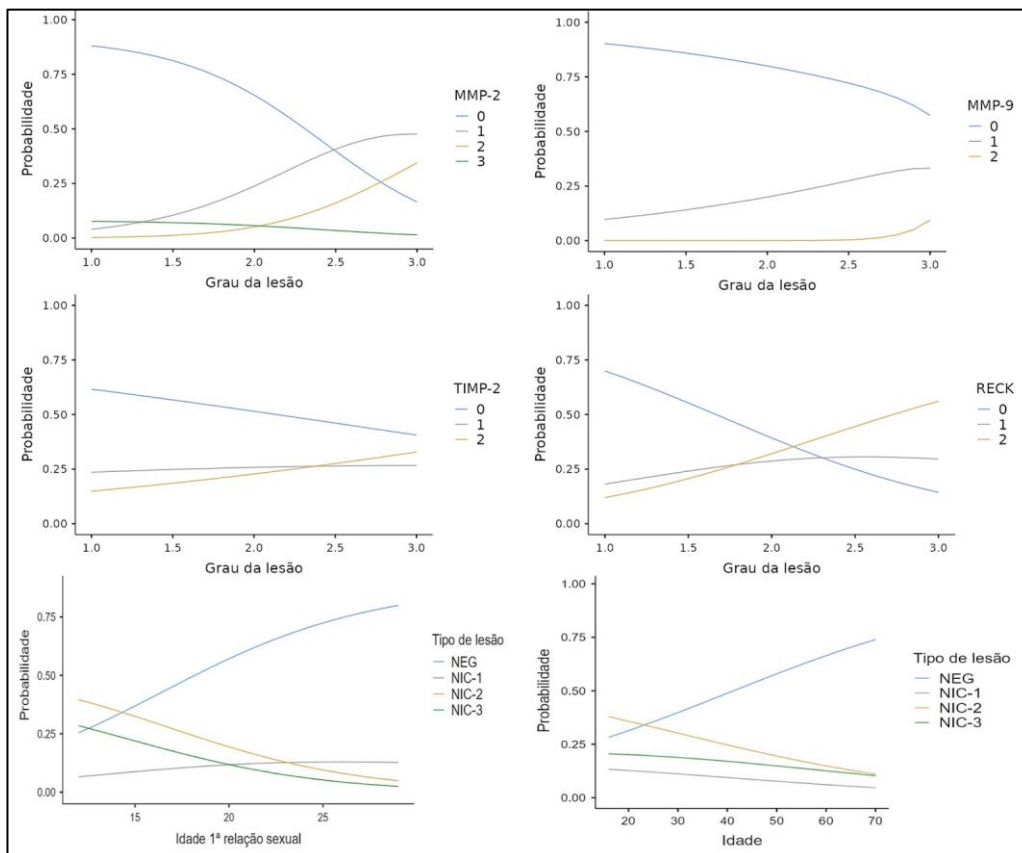
Por fim, executou-se a Regressão Logística (tabela 3) para estimar a probabilidade do grau da lesão cervical influenciar no nível de intensidade de expressão dos biomarcadores. Calculou-se, também, a razão de chances (RC), analisando-se, para os diferentes graus de lesão, as chances dos níveis de expressão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

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

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

Biomarcador	Frac/Ausente		Moderada/Ausente		Intensa/Ausente	
	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)
MMP-2	0,001	7,938	0,004	26,706	1,00	1,00
MMP-9	0,115	2,318	0,723	916,858	-	-
TIMP-2	0,502	1,310	0,167	1,829	-	-
RECK	0,025	2,819	<0,001	4,785	-	-

Variável clínica	NIC-1/NEG		NIC-2/NEG		NIC-3/NEG	
	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)	p	RC (IC 95%)
1ª Relação sexual	0,678	0,97	0,002	0,83	0,003	0,81
Idade	0,110	0,96	0,013	0,96	0,096	0,97



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

DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CONCLUSÃO

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

AMABEBE, E.; OGIDI, H.; ANUMBA, D. O. Matrix metalloproteinase-induced cervical extracellular matrix remodelling in pregnancy and cervical cancer. **Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. R177–R191, 2022. DOI <https://doi.org/10.1530/RAF-22-0015>.

AZEVEDO MARTINS, J. M. *et al.* Tumoral and stromal expression of MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, and VEGF-A in cervical cancer patient survival: a competing risk analysis. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 660, 2020. DOI <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07150-3>.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

CARDEAL, L. B. D. S. *et al.* HPV16 Oncoproteins Induce MMPs/RECK-TIMP-2 Imbalance in Primary Keratinocytes: Possible Implications in Cervical Carcinogenesis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e33585, 2012. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033585>.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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