

Caracterização do perfil de proteínas em mulheres com o diagnóstico de lesão intraepitelial cervical de alto grau e HPV16 positivo

Kamila Pereira de Araujo^a, Instituto Leônidas e Maria Diane – ILMD/Fiocruz Amazônia, Instituição Fametro Manaus- Amazonas-Brasil, kamila.araujo0279@gmail.com; Alessandra Silva e Silva², Instituto Leônidas e Maria Diane – ILMD/Fiocruz Amazônia, Manaus- Amazonas-Brasil; Rosyana de Fátima Vieira de Albuquerque³, Instituto Leônidas e Maria Diane – ILMD/Fiocruz Amazônia, Manaus-Amazonas-Brasil; Luana Quadros de Souza Leão⁴, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus- Amazonas-Brasil; Anderson Ferreira Gonçalves⁵, Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, Manaus-Amazonas-Brasil; Marlon Dias Mariano dos Santos⁶, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brasil; Paulo Costa Carvalho⁷, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, Curitiba, Paraná, Brasil; Priscila Ferreira de Aquino⁸, Instituto Leônidas e Maria Diane – ILMD/Fiocruz Amazônia, Manaus-Amazonas-Brasil.

1. Introdução

O câncer de colo do útero (CCU), ou câncer cervical, é uma doença de progressão lenta e que geralmente se desenvolve a partir da persistência de neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Quando essas alterações não são tratadas, podem evoluir para o carcinoma invasivo (1). A infecção persistente por determinados tipos oncogênicos de papilomavírus humano (HPV) representa o principal fator de risco, desempenhando papel central na transformação maligna. Até o momento, mais de 200 genótipos de HPV já foram identificados (2–4). Entre eles, 13 são classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como de alto risco oncogênico, estando diretamente associados ao desenvolvimento de NIC de alto grau e ao câncer cervical. O HPV 16 é o mais prevalente, responsável por cerca de 60% dos casos, seguido pelo HPV 18 (10,5%) (5,6).

No Brasil, o câncer de colo do útero representa um grave problema de saúde pública, com estimativa de 17.010 novos casos anuais para 2023-2025, correspondendo a uma taxa bruta de incidência de 15,38 casos por 100 mil mulheres (1). No entanto, quando se analisa cada região, observa-se que as maiores taxas de incidência e o maior número de novos casos ocorre nas regiões Norte (20,48/100 mil) e Nordeste (17,59/100 mil), seguida pela Centro-Oeste (16,66/100 mil), enquanto nas regiões Sul (14,55/100 mil) e Sudeste (12,93/100 mil) ocupam posições inferiores no ranking de incidência (1). Entretanto, observa-se que no estado do Amazonas e em sua capital, Manaus, a incidência é ainda mais preocupante, com 31,71 e 36,40 casos por 100 mil mulheres, respectivamente (1,6).

Nesse contexto, a proteômica surge como uma ferramenta valiosa para aprofundar a compreensão dos mecanismos biológicos de determinadas doenças, permitindo, por exemplo, a identificação de processos moleculares críticos, a descoberta de potenciais alvos farmacológicos específicos em etapas do desenvolvimento celular tumoral e a determinação de biomarcadores relacionados à patologia (7). Especificamente na oncogênese cervical, essa abordagem tem sido utilizada para identificar proteínas que se diferenciam entre tecidos normais e neoplásicos do colo do útero, contribuindo para o entendimento das alterações proteicas associadas à oncogênese (8).

2. Material e Método

Este projeto foi realizado no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz Amazônia), em parceria com a Fundação Centro de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), responsável pela seleção das pacientes e coleta das amostras. Além disso, o projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON (CAAE n.º 57108122.5.0000.0004). Posteriormente, as análises por espectrometria de massas (MS/MS) foram conduzidas no Instituto Carlos Chagas (ICC/Fiocruz Paraná). Ademais, mulheres com diagnóstico histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau e HPV16 positivo, que estavam em tratamento na FCECON concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Para complementar, foram consultados

os prontuários, a fim de obter informações adicionais sobre o perfil clínico e o tratamento das pacientes. Destas, foram coletadas amostras de tecido provenientes das lesões precursoras, as quais foram avaliadas por meio da técnica de proteômica *shotgun*, associada à aplicação de ferramentas computacionais para inferir o perfil proteico da população estudada.

3. Resultados e Discussão:

Foram analisadas 10 amostras de mulheres que atendiam aos critérios do estudo. A maioria declarou ser natural do estado do Amazonas, evidenciando a predominância de participantes locais, enquanto uma parcela menor era originária do Pará, refletindo a diversidade geográfica do grupo estudado. Além disso, foi possível observar que as pacientes tinham em média 35,1 anos, com variação entre 30 e 50 anos. Observou-se também que 40% das participantes iniciaram a vida sexual antes dos 15 anos e realizavam o exame preventivo com intervalo superior a três anos, enquanto 70% relataram o uso de métodos contraceptivos. Quanto à análise proteômica, e considerando as características histopatológicas, as pacientes positivas pelo HPV16 foram divididas em dois grupos, um com 5 pacientes de NIC2 e outro com 5 pacientes de NIC3.

A análise proteômica revelou um conjunto diversificado de proteínas, envolvidas em múltiplos processos biológicos essenciais para a atividade molecular e a organização de diferentes compartimentos celulares. No total, foram identificadas 1.234 proteínas redundantes, envolvidas em processos como regulação da apoptose, reparo do DNA, resposta imune, metabolismo energético, transporte vesicular e processamento de RNA. Embora a maior parte das proteínas tenha sido identificada em ambos os grupos (NIC2 e NIC3), foram observadas diferenças significativas (Figura 1).

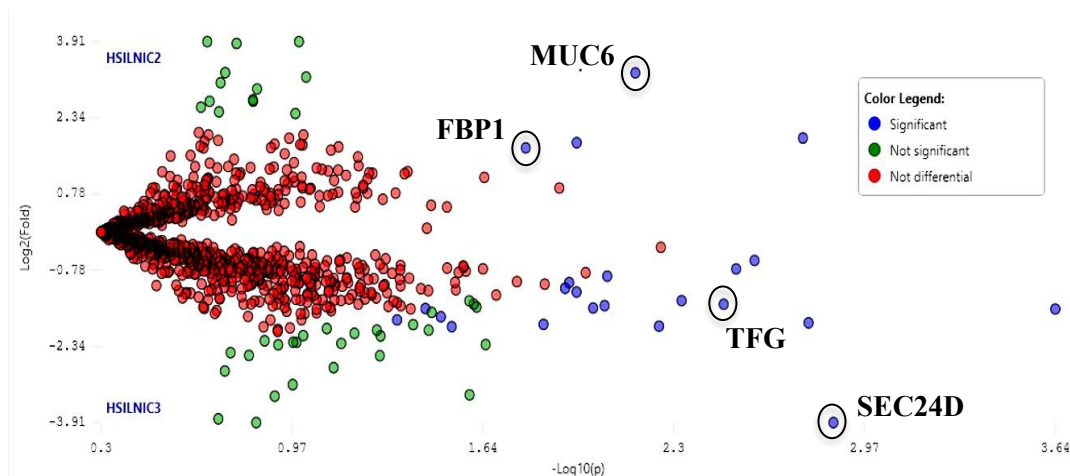


Figura 1. Gráfico Volcano da análise *T-Fold* gerado no *PatternLab*, mostrando a expressão diferencial de proteínas entre NIC2 e NIC3. O eixo x representa a significância estatística ($-\log_{10}(p)$) e o eixo y a magnitude da diferença ($\log_2(\text{Fold-change})$). Sendo em azul as significativas, verde as não significativas e vermelho, não diferenciais.

O grupo NIC2 apresentou maior abundância de determinadas proteínas, como MUC6 e FBP1, enquanto no grupo NIC3 observou-se aumento das proteínas SEC24D e TFG. A SEC24D envolvida no transporte de proteínas, é um componente essencial do complexo COPII, responsável pela formação de vesículas de transporte do retículo endoplasmático (RE) ao complexo de Golgi, e esse revestimento atua na curvatura da membrana do RE e na seleção de moléculas de carga para o tráfego intracelular (9,10). Já a MUC6 é uma mucina gelificante secretora de alto peso molecular, expressa principalmente nas glândulas profundas da mucosa gástrica, onde contribui para a formação do gel protetor da mucosa. Ela faz parte da subfamília

das mucinas gelificantes secretoras (MUC2 e MUC5AC), responsáveis por formar o gel protetor da mucosa e, em tecidos epiteliais, a MUC6 coexiste e interage funcionalmente com mucinas de membrana, como a MUC1 e MUC4, garantindo a integridade e sinalização da barreira mucosa (11,12). Embora a MUC6 não tenha sido diretamente associada ao câncer cervical ou ao HPV, a MUC4, com a qual interage, tem sido implicada na patogênese do câncer cervical e na interação com o HPV (Figura 2).

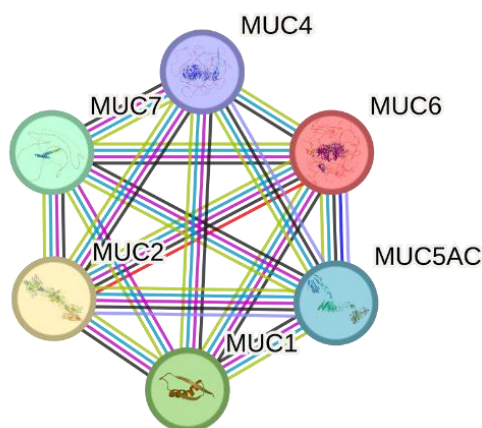


Figura 2. Rede de interações da proteína MUC6 identificada entre os grupos NIC2, gerada pelo STRING 11.0.

Com relação as análises diferenciais realizadas, conseguiu-se evidenciar proteínas exclusivas e compartilhadas entre as condições. Ao comparar lesões de NIC2 e NIC3, 31 foram exclusivas para as lesões de NIC2 e 56 exclusivas para as lesões de NIC3. Nesse contexto, em amostras de pacientes com NIC2, além das proteínas identificadas como CST3, HIBADH, SCARB2 e HACD3, IL4I1, foi identificada a expressão da mesotelina (MSLN), uma proteína ancorada por GPI (Reactome R-HSA-163125) cuja clivagem (R-HSA-8941008) e consequente acúmulo na superfície celular potencializam processos de adesão e progressão tumoral. A detecção precoce de MSLN em lesões de alto grau reforça seu possível papel na evolução da doença (13). Já em amostras de pacientes com NIC3, além das proteínas identificadas como HMGB2, RAC2, DHRS7, XRN2 e NCBP1, podemos ainda destacar a Desoxiuridina 5'-trifosfato nucleotidohidrolase, mitocondrial (DUT): Proteína que catalisa a conversão de dUTP em dUMP e pirofosfato, prevenindo a incorporação de uracila no DNA e fornecendo dUMP para a síntese de timidilato (14,15).

4. Conclusões:

A análise proteômica preliminar realizada nas 10 pacientes HPV16 positivas permitiu delinear um perfil proteico consistente, evidenciando a presença de proteínas relevantes, como MUC6, SEC24D, MSLN, entre outras. Embora a maioria das proteínas seja compartilhada entre as lesões NIC2 e NIC3, foram identificadas diferenças significativas, incluindo a detecção de conjuntos proteicos exclusivos para cada grupo (31 exclusivas em NIC2 e 56 em NIC3). Ademais, os dados epidemiológicos e clínicos obtidos corroboram com os objetivos propostos nesse projeto. Conclui-se que, apesar do tamanho amostral reduzido, os achados fornecem subsídios valiosos para futuras investigações com maior consistência estatística. A identificação desses possíveis biomarcadores contribui para o aprofundamento do entendimento dos mecanismos moleculares que regem a progressão das lesões cervicais, apontando para a viabilidade de intervenções terapêuticas e estratégias preventivas mais direcionadas, e

ênfatizando a importância de abordagens personalizadas no manejo de mulheres com diagnóstico de neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau e sua progressão para o câncer de colo do útero. No contexto do Amazonas, região com elevada incidência de HPV e câncer cervical, este estudo evidencia a relevância das ciências ômicas, que permitem analisar sistemas biológicos de forma abrangente e identificar proteínas associadas à progressão de lesões cervicais de alto grau, especialmente em pacientes HPV16 positivas. Portanto, a identificação desses biomarcadores aprofunda a compreensão da progressão das lesões cervicais e indica potencial para diagnósticos e terapias mais direcionados.

Palavras-Chave: Lesões Intraepiteliais Cervicais; Papilomavirus humano; Análise Proteômica; *Shotgun*.

Divulgação

Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

Referências

1. INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. 2022 [citado 27 de março de 2025]. INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-do-colo-do-utero-relatorio-anual-2023>
2. Silva MLLG da, Morais AMB de, Sousa MNA de. Papilomavírus humano e fatores de risco no câncer de colo uterino. Revista Eletrônica Acervo Saúde [Internet]. 3 de janeiro de 2023 [citado 29 de março de 2025];23(1):e11746. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/11746>
3. Doorbar J, Griffin H. Refining our understanding of cervical neoplasia and its cellular origins. Papillomavirus Research [Internet]. 1º de junho de 2019 [citado 7 de abril de 2025];7:176–9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405852119300266>
4. Ma X, Yang M. The correlation between high-risk HPV infection and precancerous lesions and cervical cancer. Am J Transl Res. 2021;13(9):10830–6.
5. Sichero L, Picconi MA, Villa LL. The contribution of Latin American research to HPV epidemiology and natural history knowledge. Brazilian journal of medical and biological research [Internet]. 2020 [citado 5 de maio de 2024];53(2). Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/003008020>
6. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D m., Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. International Journal of Cancer [Internet]. 2020 [citado 22 de março de 2025];144(8):1941–53. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.31937>
7. Lin M, Ye M, Zhou J, Wang ZP, Zhu X. Recent Advances on the Molecular Mechanism of Cervical Carcinogenesis Based on Systems Biology Technologies. Comput Struct Biotechnol J. 2019;17:241–50.
8. Mello V, Sundstrom RK. Cervical Intraepithelial Neoplasia. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citado 21 de março de 2025]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544371/>

9. Carine B, Markus W. W, Jean-Pierre P, Hans-Peter H. Selective export of human GPI-anchored proteins from the endoplasmic reticulum | Journal of Cell Science | The Company of Biologists [Internet]. 2010 [citado 3 de abril de 2025]. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/123/10/1705/31160/Selective-export-of-human-GPI-anchored-proteins>
10. Mota DCAM. Expressão, purificação e caracterização do domínio GOLD da proteína TMED 1 humana [Internet] [Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia]. [Ribeirão Preto]: Universidade de São Paulo; 2021 [citado 3 de abril de 2025]. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-16032021-150930/>
11. Alos L, Lujan B, Castillo M, Nadal A, Carreras M, Caballero M. Expression of Membrane-Bound Mucins (MUC1 and MUC4) and Secreted Mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in Mucoepidermoid Carcinomas of Salivary Glands [Internet]. 2005 [citado 29 de agosto de 2025]. Disponível em: https://journals.lww.com/ajsp/fulltext/2005/06000/Mucoepidermoid_Carcinoma_A_Clinicopathologic.00011.aspx?casa_token=W14k9nX9JSgAAAAA:XMTgZiUjOHcXPNVWRdrlhF7XVKoaXvG3ufcArCndakyeEjRzzDPEWBBvGfT7tHUCISWIEEzrH6trjynp75fuOg4
12. Dong-Han W, Jong-Ho C, Youn-Sang J. Mucin in cancer: a stealth cloak for cancer cells - PMC [Internet]. 2021 [citado 29 de agosto de 2025]. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8328826/>
13. Takamizawa S, Yazaki S, Kojima Y, Yoshida H, Kitadai R, Nishikawa T, et al. High mesothelin expression is correlated with non-squamous cell histology and poor survival in cervical cancer: a retrospective study | BMC Cancer [Internet]. 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12885-022-10277-0>
14. Jingyu P, Minxu W, Jiahua Z, Yuxing H, Fan Z, Erchao L, et al. Quantitative proteomic and metabolomic profiling reveals different osmoregulation mechanisms of tilapia cells coping with different hyperosmotic stress. Journal of Proteomics [Internet]. 30 de março de 2024 [citado 1º de abril de 2025];296:105113. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391924000459>
15. Wang YP, Sharda A, Xu SN, Gastel N van, Man CH, Choi U, et al. Malic enzyme 2 connects the Krebs cycle intermediate fumarate to mitochondrial biogenesis. Cell Metabolism [Internet]. 4 de maio de 2021 [citado 1º de abril de 2025];33(5):1027-1041.e8. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-metabolism/abstract/S1550-4131\(21\)00110-8](https://www.cell.com/cell-metabolism/abstract/S1550-4131(21)00110-8)