



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

ANA KARINA BRIZENO FERREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DE
MATRIZ (MMP-2 e MMP-9) E SEU INIBIDOR (TIMP-2) EM PACIENTES
PORTADORES DE NÓDULOS TIREOIDIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM ASPECTOS ULTRASSONOGRÁFICOS**

Recife

2017

ANA KARINA BRIZENO FERREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO IMUNOCITOQUÍMICA DAS METALOPROTEINASES DE
MATRIZ (MMP-2 e MMP-9) E SEU INIBIDOR (TIMP-2) EM PACIENTES
PORTADORES DE NÓDULOS TIREOIDIANOS E SUA ASSOCIAÇÃO
COM ASPECTOS ULTRASSONOGRÁFICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como pré requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Departamento de Patologia, CCS/UFPE

Co-orientador:

Prof. Dra. Bárbara Simas Chagas

Departamento de Genética, CCS/UFPE

Recife

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- L864a Lopes, Ana Karina Brizeno Ferreira.
Avaliação imunocitoquímica das metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e seu inibidor (TIMP-2) em pacientes portadores de nódulos tireoidianos e sua associação com aspectos ultrassonográficos / Ana Karina Brizeno Ferreira Lopes. – 2017.
77 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.
- Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Metaloproteinases da matriz. 2. Neoplasias da glândula tireoide. 3. Nódulo da glândula tireoide. 4. Imuno-histoquímica. 5. Ultrassonografia. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-216)

ANA KARINA BRIZENO FERREIRA LOPES

Avaliação imunocitoquímica das metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e seu inibidor (TIMP-2) em pacientes portadores de nódulos tireoidianos e sua associação com aspectos ultrassonográficos. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Patologia. Universidade Federal de Pernambuco.

Dissertação aprovada em: 21/02/2017

Banca Examinadora:

Examinador Interno: **Prof. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas**

Departamento de Patologia, CCS-UFPE

Assinatura: _____

Examinador Interno: **Prof. Dra. Ivone Antônia de Souza**

Departamento de Patologia, CCS-UFPE

Assinatura: _____

Examinador Externo: **Prof. Dra. Elyda Gonçalves de Lima**

Departamento de Genética, CCS-UFPE

Assinatura: _____

Recife

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir alcançar mais uma conquista.

A todos meus familiares, pelo apoio de sempre e pela compreensão nos momentos de ausência.

A meu orientador e minha co-orientadora, pela paciência de ensinar, pela disponibilidade mesmo a distância e pela confiança no meu trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Patologia, por todo o conhecimento transmitido, e a todos que fazem parte direta e indiretamente deste programa pela dedicação e colaboração.

A banca examinadora, por aceitar o convite e contribuir para a conclusão deste trabalho.

Aos membros da equipe "Tireoide", que colaboraram em diversas etapas desta longa jornada.

Aos colegas de laboratório, pela experiência repassada e ajuda nas horas essenciais.

Aos amigos da turma de mestrado, pela parceria e amizades verdadeiras construídas.

A minha equipe da radiologia do Hospital das Clínicas, por me acompanhar e auxiliar durante os procedimentos de coleta.

A todos os funcionários e membros da patologia do Hospital das Clínicas pela disponibilidade em ajudar.

Aos pacientes, que mesmo em situação de fragilidade, se voluntariaram para esta pesquisa e permitiram fazer de sua doença esta fonte de aprendizado.

RESUMO

Patologias da tireoide sob a forma de nódulos são frequentes na população. Apesar da maioria ser benigno, os nódulos malignos exigem tratamento preciso, visando melhorar a sobrevida e diminuir as morbidades relacionadas a doença e a seu tratamento. Os principais métodos diagnósticos não cirúrgicos para o estudo desta patologia são a ultrassonografia e a punção aspirativa com agulha fina (PAAF), porém estes ainda apresentam limitações. Portanto, estudos moleculares podem ser uma alternativa para esta avaliação, como a análise das metaloproteinases de matriz (MMP). As MMP são enzimas degradadoras da matriz extracelular e estão fortemente relacionadas com o processo carcinogênico de vários tumores, principalmente os subtipos MMP-2 e MMP-9. Suas atividades podem ser suprimidas pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), pois a redução dos valores séricos destes inibidores são observadas em diversos cânceres. Com base nisso, este trabalho objetivou o estudo de 90 pacientes portadores de nódulos tireoideanos, visando demonstrar a relação entre a expressão das MMP e TIMP com os achados citológico através do método de imunocitoquímica, realizado com amostras coletadas por PAAF guiada por ultrassonografia destes nódulos. Além disso, foi realizado uma avaliação sobre o perfil epidemiológico destes pacientes e uma associação dos achados ultrassonográficos ao diagnóstico pós-punção. A análise dos dados mostrou que as proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 estão superexpressas nas lesões malignas tireoideanas, com resultados respectivamente de 100%, 100% e 81,81%. A imunoreatividade para MMP-9 e TIMP-2 foi útil para distinguir benignidade e malignidade. Observou-se uma tendência a malignidade em pacientes do sexo masculino, com idade superior a 45 anos e submetidos ao iodo radioativo. Quanto aos achados ultrassonográficos foi evidenciado que a composição sólida, hipocogenicidade, margens não circunscritas, eixo perpendicular e presença de microcalcificação podem ser utilizados como parâmetros para prever suspeição destes nódulos; e a classificação TIRADS deve ser aplicada na prática clínica para indicar quando realizar a PAAF destes nódulos.

Palavras chave:

Metaloproteinases da matriz. Neoplasias da glândula Tireoide. Nódulo da glândula tireoide. Imuno-histoquímica. Ultrassonografia.

ABSTRACT

Pathologies of the thyroid gland in the form of nodules are quite frequent in the population. Although most are benign, malignant nodules when present require precise treatment to improve survival and decrease disease-related morbidities and treatment. The main current non-surgical diagnostic methods for the study of this pathologist are ultrasonography and fine needle aspiration, but these still have limitations. Therefore, molecular studies may be useful as an alternative to this evaluation; among these alternatives is the analysis of matrix metalloproteinases (MMP). MMPs are extracellular matrix degrading enzymes and are strongly related to the carcinogenesis process of several tumors, mainly the MMP-2 and MMP-9 subtypes. Its activity can be suppressed by the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), and the reduction of the serum values of these inhibitors are observed in several cancers. Based on this, this project aimed at the study of 90 patients with thyroid nodules, aiming to demonstrate the relationship between MMP and TIMP expression with the cytological findings of these lesions through the immunocytochemistry method, performed with samples collected by fine-needle aspiration puncture guided by ultrasonography of these nodules. In addition, an evaluation was made on the epidemiological profile of these patients and an association of the ultrasound findings to the post-puncture diagnosis. Data analysis showed that MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 proteins are overexpressed in thyroid malignancies. Immunoreactivity for MMP-9 and TIMP-2 was useful to distinguish benignity and malignancy in lesions of this gland. There was a tendency to malignancy in male patients, aged over 45 years and submitted to radioactive iodine. Regarding the ultrasound findings, it was evidenced that the solid composition, hypoechogenicity, noncircumscribed margins, perpendicular axis and presence of microcalcification can be used as parameters to predict thyroid nodule suspicion; and the TIRADS classification should be applied in clinical practice to indicate when to perform fine-needle aspiration.

Keywords: Matrix metalloproteinases. Thyroid neoplasms. Thyroid nodule. Immunohistochemistry. Ultrasonography.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Altura
CB	Centro de Ciências Biológicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
FDG	2-[F18]-fluoro-2-deoxi-glicose
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HC	Hospital das Clínicas
IC	Intervalo de confiança
ICQ	Imunocitoquímica
IHQ	Imunohistoquímica
IMC	Índice de Massa Corpórea
LEMTE	Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental
LPCM	Laboratório de Pesquisa Citológicas e Moleculares
Liqui-PREP	Meio líquido de preservação celular
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
MT-MMP	Metaloproteinase de matriz tipo membrana
NEM-2	Neoplasia endócrina múltipla tipo 2
OR	Odds Ratio (Razão de Chances)
PAAF	Punção aspirativa com agulha fina
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)
P	Peso
PET	Tomografia por emissão de positrons
Pro-MMP	Forma latente da metaloproteinase (pro-enzima)
PTC	Papillary thyroid carcinoma (Carcinoma papilífero da tireoide)
T3	Hormônio triiodotironina
T4	Hormônio tetraiodotironina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIMP	Inibidor tecidual da metaloproteinase
TIRADS	Thyroid Imaging Reporting and Data System
TSH	Thyroid-Stimulating Hormone (Hormônio estimulante de tireoide)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USG	Ultrassonografia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Parâmetros Ultrassonográficos: Composição dos Nódulos Tiroideanos	21
Figura 2	Parâmetros Ultrassonográficos: Ecogenicidade dos Nódulos Tiroideanos	21
Figura 3	Parâmetros Ultrassonográficos: Margens dos Nódulos Tiroideanos	22
Figura 4	Parâmetros Ultrassonográficos: Forma dos Nódulos Tiroideanos	22
Figura 5	Parâmetros Ultrassonográficos: Calcificação dos Nódulos Tiroideanos	23
Figura 6	Análise Citológica de Nódulos tiroideanos – Classificação Bethesda	26
Figura 7	Estrutura protéica das metaloproteinases de matriz	28
Figura 8	Estrutura proteíca das gelatinases	30
Figura 9	Imunocitoquímica em nódulo Bethesda II (Bócio Nodular)	48
Figura 10	Imunocitoquímica em nódulo Bethesda II (Tireoidite Crônica)	49
Figura 11	Imunocitoquímica em nódulo Bethesda III	49
Figura 12	Imunocitoquímica em nódulo Bethesda VI	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Indicações de PAAF em nódulo tireoideano	24
Tabela 2	Classificação TIRADs e Risco de malignidade do nódulo tireoideano	24
Tabela 3	Sistema Bethesda para laudos citopatológicos de tireoide	25
Tabela 4	Principais metaloproteinases e seus substratos	29
Tabela 5	Especificação dos anticorpos da imunocitoquímica	36
Tabela 6	Parâmetro das variáveis categóricas epidemiológicas	37
Tabela 7	Parâmetro das variáveis categóricas ultrassonográficas	37
Tabela 8	Resultado citológico dos nódulos tireoideanos	40
Tabela 9	Resultado do perfil epidemiológico dos pacientes com nódulos tireoideanos	42
Tabela 10	Resultado do aspecto ultrassonográfico dos 120 nódulos tireoideanos puncionados	45
Tabela 11	Distribuição dos nódulos pela classificação TIRADS	46
Tabela 12	Percentual de distribuição dos nódulos benignos pela classificação TIRADS	46
Tabela 13	Percentual de distribuição dos nódulos malignos pela classificação TIRADS	46
Tabela 14	Resultado imunocitoquímico da expressão dos anticorpos de acordo com a classificação Bethesda	48
Tabela 15	Expressão dos anticorpos no grupo com bócio nodular e nódulo folicular benigno	50
Tabela 16	Expressão dos anticorpos no grupo com tireoidite crônica linfocítica	50
Tabela 17	Expressão dos anticorpos no grupo com atipia de significado indeterminado	50
Tabela 18	Expressão dos anticorpos no grupo com malignidade	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Tireoide e Nódulos Tireoideanos.....	17
2.2	Ultrassonografia e Punção Aspirativa.....	19
2.3	Metaloproteinases de Matriz e seus Inibidores.....	27
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Tipo de Estudo.....	33
4.2	Local de Coleta das Amostras.....	33
4.3	População alvo e período.....	33
4.4	Critérios de Inclusão.....	33
4.5	Critérios de exclusão.....	33
4.6	Método de Coletas no HC.....	33
4.6.1	Coleta Citológica – PAAF.....	34
4.6.2	Resgate dos laudos citológicos.....	34
4.7	Aspectos Éticos da Pesquisa.....	34
4.8	Análises Laboratoriais: Imunocitoquímica.....	35
4.9	Análise Computadorizada de Imagens.....	36
4.10	Análise estatística.....	36
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Resultados Citológicos.....	39
5.2	Perfil Epidemiológico.....	40
5.3	Resultados Ultrassonográficos.....	43
5.4	Resultados Imunocitoquímicos.....	47
6	DISCUSSÃO.....	52
6.1	Dados epidemiológicos.....	52
6.2	Dados ultrassonográficos.....	55
6.3	Dados imunocitoquímicos.....	56
7	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

APÊNDICES	64
Apêndice A - Questionário da Coleta.....	64
ANEXOS.....	66
Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	66
Anexo B - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em....	68
 Pesquisa.....	
Anexo C - Short Communication - Experimental Pathology and..	75
 Health Sciences 2015;7 (2): 53-54.....	

1 INTRODUÇÃO

A tireoide é uma glândula endócrina responsável pela produção de hormônios essenciais para a saúde do indivíduo (WHITE; PORTERFIELD, 2013). A principal forma de expressão de modificação no seu parênquima é através de alterações focais, nódulos tireoideanos (ROSÁRIO et al., 2013).

Os nódulos tireoideanos acometem cerca de 50% dos indivíduos adultos, destes 5% a 7% apresentam natureza maligna (NACHIAPPAN et al., 2014). Esta é a neoplasia que apresenta maior taxa de crescimento, com mais de 5% ao ano; isto se deve ao aumento do uso de métodos por imagem, com o diagnóstico de lesões subclínicas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

O principal exame de imagem para avaliação desta glândula é a ultrassonografia (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014). Por meio deste método é possível estimar o risco de malignidade do nódulo através de parâmetros como a sua composição, ecogenicidade, margens, forma, e evidência de calcificação (KWAK et al., 2011). A punção aspirativa com agulha fina com aquisição de amostra citológica, também ajuda nesta avaliação entre nódulos benignos e malignos (NACHIAPPAN et al., 2014); porém apresenta ainda limitações, que podem ser melhor avaliadas por estudos de imunologia (HORVATH et al., 2009).

Desta forma, novos métodos ou marcadores para alterações tireoideanas pode contribuir para um diagnóstico precoce. Entre os possíveis marcadores para avaliação de alterações nessa glândula está a análise das metaloproteinases de matriz (MMP). As MMP são enzimas proteolíticas degradadoras de componentes da matriz extracelular e da membrana basal. Seus inibidores específicos são encontrados em diferentes tipos histológicos tumorais, atuando em diversas etapas da carcinogênese (KRAIEM; KOREM, 2000). Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dessas proteínas através da imunocitoquímica em neoplasias benignas e malignas da tireoide, que se expressam por meio de nódulos tireoideanos detectados em ultrassonografia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tireoide e Nódulos Tireoideanos

A tireoide é uma glândula localizada na região cervical anterior baixa (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; NACHIAPPAN et al., 2014). Situa-se anteromedialmente aos grandes vasos cervicais (artéria carótida e veia jugular interna) e posteriormente aos músculos cervicais (NACHIAPPAN et al., 2014). Anatomicamente pode ser dividida em dois lobos, direito e esquerdo, sendo conectados anteriormente à traqueia por uma fina quantidade de tecido, denominada istmo (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; WHITE; PORTERFIELD, 2013).

Seu epitélio glandular é formado com uma camada única de células cubóides, denominadas de células foliculares, responsáveis pela produção dos hormônios triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4). Estas células se organizam em círculos, formando o folículo tireoideano, unidade anátomo-funcional da tireoide, que em seu interior armazena o colóide, uma substância gelatinosa rica em tireoglobulina. As células parafoliculares correspondem a outro subtipo celular, e também são conhecida por células C, por atuarem na síntese de calcitonina (WHITE; PORTERFIELD, 2013).

Os nódulos de tireoide são frequentes na população, ocorrendo em 50% dos indivíduos adultos (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; NACHIAPPAN et al., 2014); deste nódulos, cerca de 5% a 7% são malignos (COELI et al., 2005; HORVATH et al., 2009; KWAK et al., 2011). A taxa de incidência de neoplasia desta glândula tem aumentado nos últimos anos, apesar disso, a mortalidade apresenta queda contínua (INCA, 2014). A estimativa americana foi de 64.300 casos novos deste câncer para o ano de 2016, com maior prevalência em mulheres, porém com mortalidade próxima entre os gêneros (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016). Diferentemente da maioria dos cânceres, apresenta alto acometimento na população adulta jovem, abaixo dos 40 anos (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008). A incidência de câncer de tireoide no Brasil é de cerca de 24 casos por 100.000 habitantes (ROSÁRIO et al., 2013), sendo a quinta neoplasia mais comum no sexo feminino (INCA, 2014). Na região Nordeste, esta neoplasia é a 13^a mais incidente em homens e a 6^a em mulheres (INCA, 2016).

As principais patologias que podem se apresentar na forma de nódulos tireoideanos são: a. benignos – nódulo folicular benigno (inclui nódulo adenomatóide

e nódulo colóide), adenoma folicular e tireoidite; b. malignos – carcinoma papilífero (PTC), carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma medular, linfoma e metástase (HEGEDÜS, 2004; NACHIAPPAN et al., 2014).

A maioria dos cânceres de tireóide, cerca de 90%, são de origem epitelial (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008). Os tipos histológicos mais frequentes são os carcinomas papilífero (75-80%), seguido pelo folicular (10-20%), medular (5-10%) e anaplásico (1-2%) (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; INCA, 2016). Esses tumores originam-se de células foliculares, exceto o carcinoma medular, o qual deriva das células parafoliculares. Podem ser divididos em tumores bem diferenciados, carcinoma papilífero e folicular; moderadamente diferenciados, medular; e indiferenciados, anaplásico (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008). Os tumores não epiteliais são raros, sendo incluídos neste grupo o sarcoma, linfoma maligno e hemangioendotelioma.

O PTC dentre todos os câncer de tireóide é o que possui melhor prognóstico e melhor taxa de sobrevida; é mais comum em mulheres e no grupo etário menor que 40 anos. Pode se apresentar da forma multifocal em até 20% dos casos, e sua disseminação metastática é mais comum por via linfática para linfonodos cervicais (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014).

O carcinoma folicular também apresenta um bom prognóstico, apesar de sobrevida inferior ao PTC (COELI et al., 2005); acomete mais mulheres da faixa etária dos 60 anos, e sua disseminação metastática ocorre mais por via hematogênica para osso, cérebro, pulmão e fígado. A citologia do aspirado de punção não permite diferenciação entre adenoma e carcinoma folicular, sendo em geral o diagnóstico histológico cirúrgico necessário para sua distinção (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014).

O carcinoma medular, por originar-se de células parafoliculares produtoras de calcitonina, podem provocar elevação dos níveis séricos desse hormônio (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014). Este tumor, em geral, apresenta relação com herança familiar, e está associado a neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (NEM-2) em 10% a 20% dos casos (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008).

O subtipo anaplásico é o mais agressivo de todos os carcinomas primários da glândula, comumente sendo fatal (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014). É infrequente antes do 50 anos, e não apresenta predileção por sexo (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008). Tende a se apresentar com grandes dimensões, com

invasão de tecidos moles adjacentes e traqueia, e com linfonodomegalias cervical (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014).

O linfoma da tireoide é raro, representando menos que 5% das neoplasias desta glândula. Pode se apresentar da forma primária, como linfoma não-Hodking, ou secundário na forma generalizada. Ao diagnóstico, em geral é uma massa de grande volume, com rápido crescimento, assim como o anaplásico (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014).

Apesar da maior frequência de nódulos tireoideanos no sexo feminino, e conseqüentemente maior número de casos de câncer de tireoide (INCA, 2014; NACHIAPPAN et al., 2014), a maior probabilidade de malignidade destes tumores ocorre no sexo masculino (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; ROSÁRIO et al., 2013). Outros fatores clínicos de risco para câncer de tireoide são: idade abaixo dos 15 anos e acima dos 45 anos (NACHIAPPAN et al., 2014), exposição à radiação ionizante (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008; INCA, 2014), exposição à radiação na região da cabeça e pescoço (COELI et al., 2005), tireoidectomia parcial prévia por câncer de tireoide (ROSÁRIO et al., 2013), e história familiar (COELI et al., 2005). Além disso, síndromes hereditárias como NEM-2, Síndrome de Cowden, Síndrome de Pendren, Síndrome de Werner, Complexo de Carney, Polipose Adenomatosa Familiar (incluindo Síndrome de Garner) (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008) e pacientes oncológicos com achado incidental a tomografia por emissão de positrons (PET) de nódulo tireoideano com captação ao FDG (2-[F18]-fluoro-2-deoxi-glicose) (ROSÁRIO et al., 2013) possuem risco aumentado de desenvolver esta malignidade.

Achados do exame físico também devem ser valorizados, como nódulo endurecido, com pouca mobilidade (aderência a planos profundos), com rápido crescimento, volumoso com sintomas compressivos, disфонia (paralisia ipsilateral de corda vocal), e linfonodomegalias em cadeia cervical (ROSÁRIO et al., 2013).

2.2 Ultrassonografia e Punção Aspirativa

A ultrassonografia (USG) é o exame complementar de escolha para a avaliação inicial da tireoide (CHENG et al., 2013; ROSÁRIO et al., 2013). Seu aspecto ultrassonográfico normal é uma ecotextura homogênea e hiperecótica quando comparada aos músculos cervicais adjacentes (NACHIAPPAN et al., 2014). Suas dimensões variam em torno de 4-6cm no comprimento craniocaudal, 1,3 a

1,8cm nos diâmetros anteroposterior e transverso, e espessura do istmo no diâmetro anteroposterior menor que 0,6cm (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014).

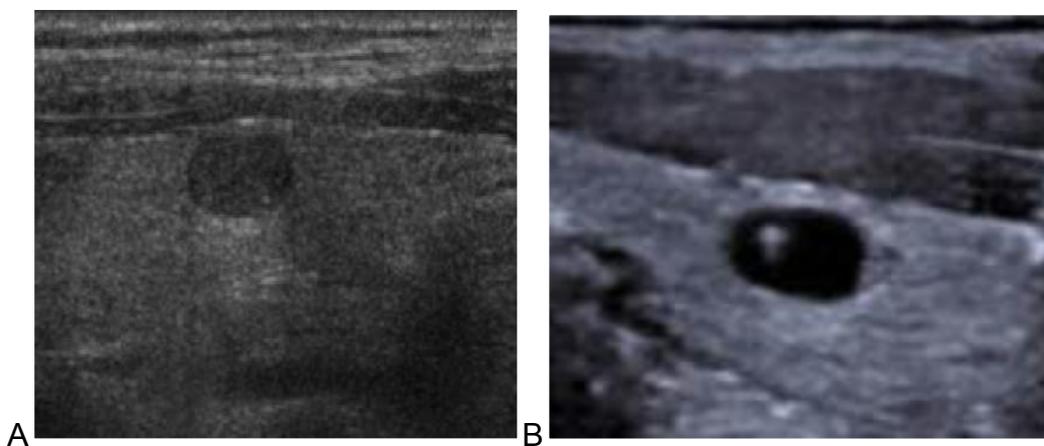
Na avaliação ultrassonográfica dos nódulos tireoideanos, utilizam-se vários parâmetros para sua caracterização, sendo os principais a composição do nódulo, a ecogenicidade, as margens, a forma, e a evidência de calcificação (KWAK et al., 2011). Quanto a composição, o nódulo é categorizado em sólido, cístico ou misto (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014) (Figura 1).

Classifica-se a ecogenicidade em comparação ao parênquima da glândula: hiperecótico, quando maior; isoecótico, quando semelhante; hipoecótico, quando inferior; anecótico; e heterogêneo, quando apresenta mais de um padrão. Se a ecogenicidade for menor que a musculatura adjacente, denomina-se marcadamente hipoecótico (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; PARK et al., 2009) (Figura 2).

As margens podem ser circunscritas, ou não-circunscritas, incluindo limites mal definidos e irregulares (KWAK et al., 2011) (Figura 3).

Já na forma, distribuem-se em mais alto do que largo (verticalizado), mais largo do que alto (horizontalizado) e arredondado (PARK et al., 2009) (Figura 4).

Os nódulos apresentam-se sem ou com calcificação, e quando presentes, subcategorizam em dois grupo: microcalcificação, se igual ou menor que 1mm, e macrocalcificação, se maior que 1mm (KWAK et al., 2011) (Figura 5).



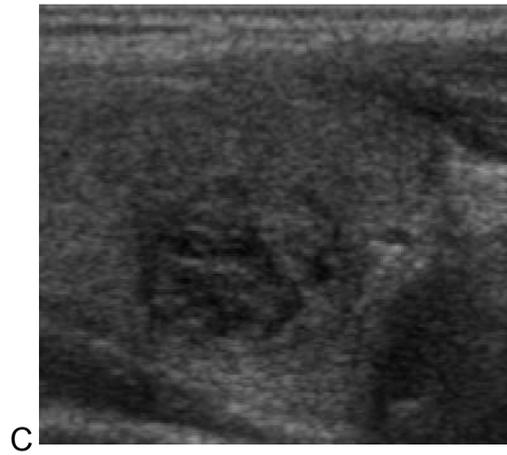


Figura 1. Parâmetros Ultrassonográficos: Composição dos Nódulos Tiroideanos – A)sólido, B)cístico, C)misto.

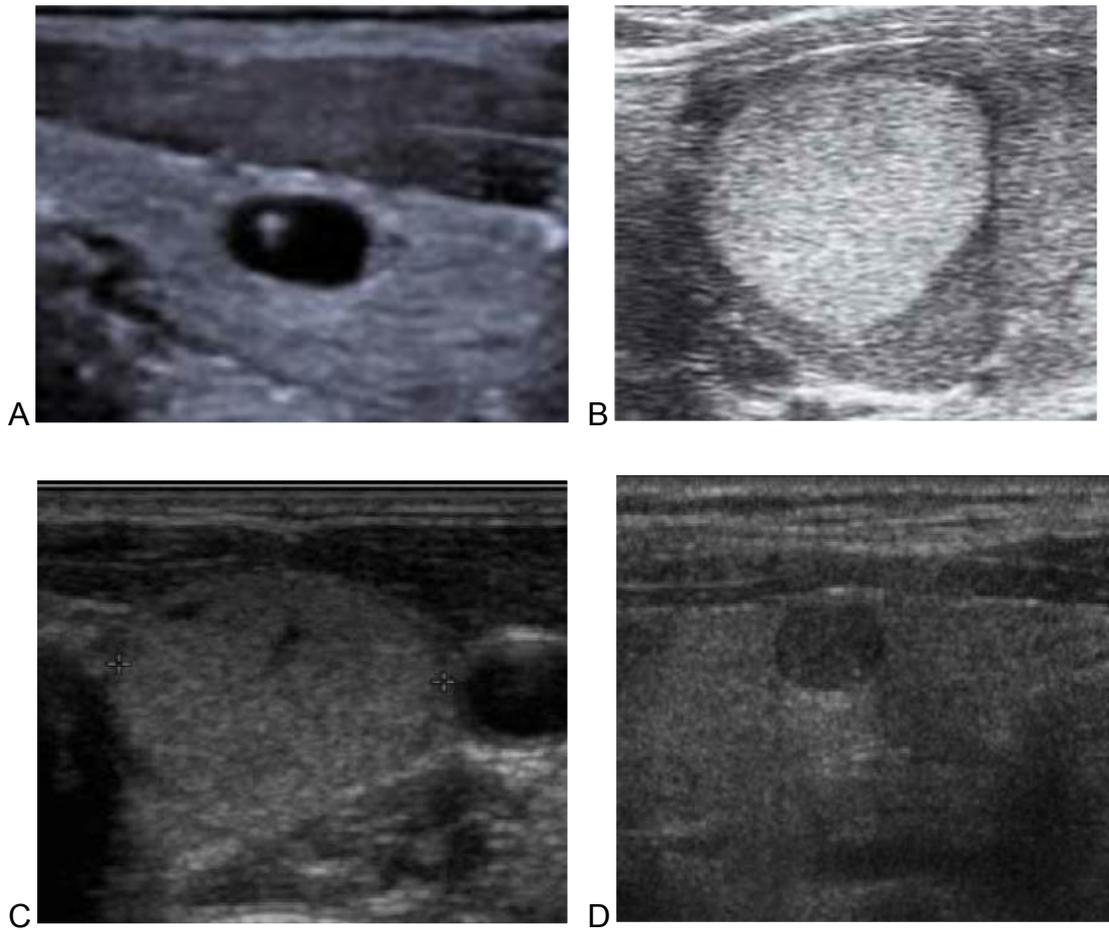


Figura 2. Parâmetros Ultrassonográficos: Ecogenicidade dos Nódulos Tiroideanos – A)anecóico B)hiperecóico, C)isoecóico, D)hipoecóico.

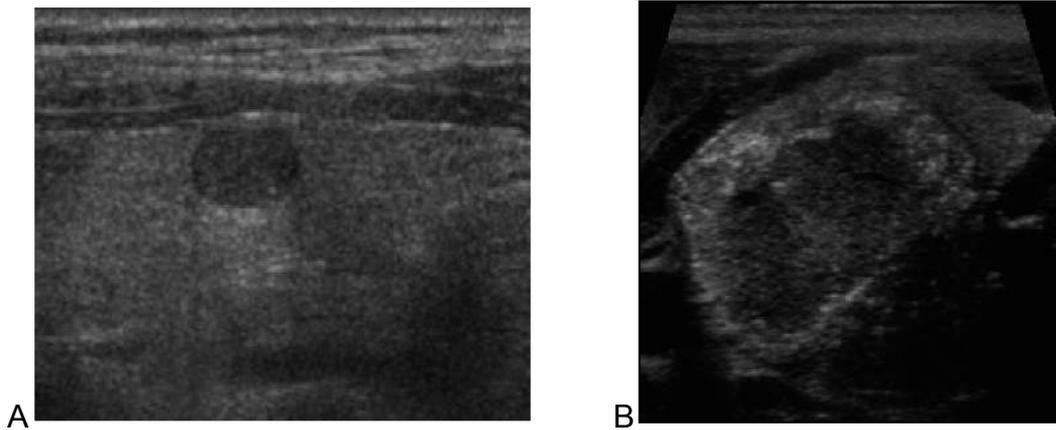


Figura 3. Parâmetros Ultrassonográficos: Margens dos Nódulos Tireoideanos – A)circunscrita, B)não circunscrita (irregular).

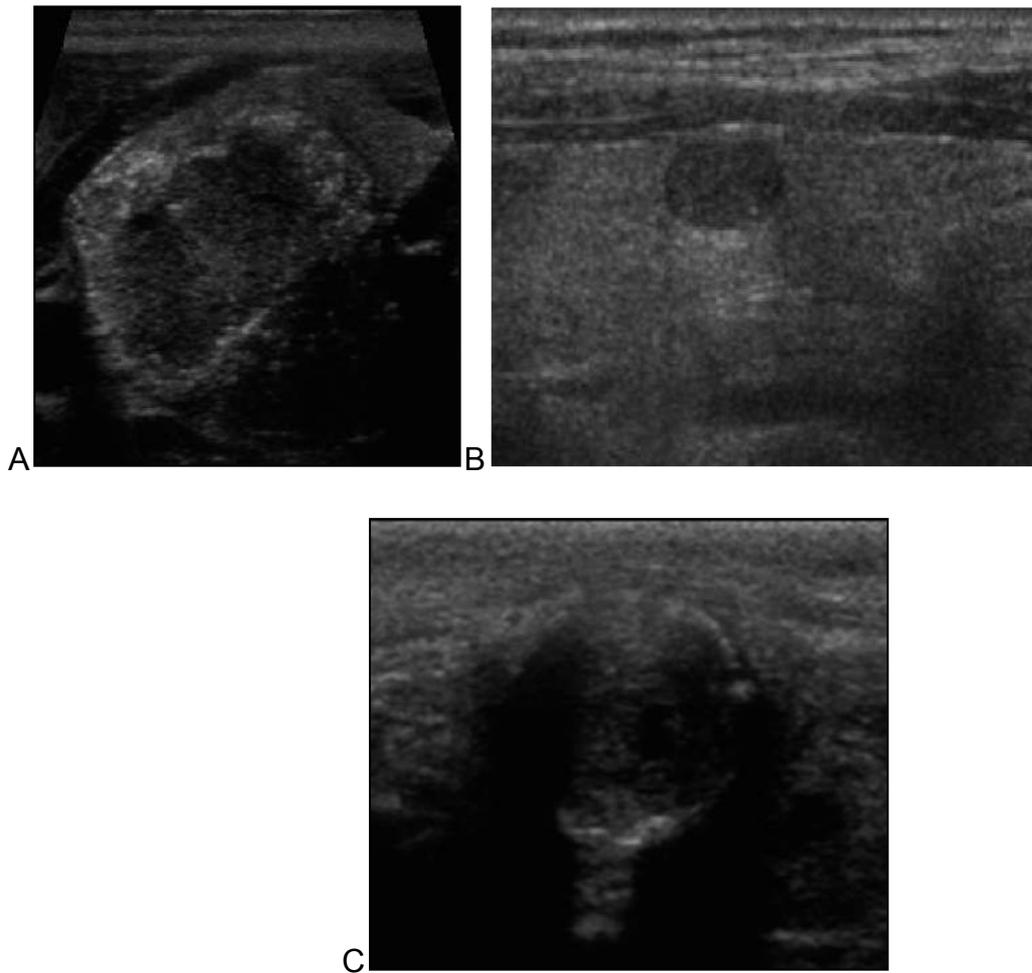


Figura 4. Parâmetros Ultrassonográficos: Forma dos Nódulos Tireoideanos – A)vertical, B)horizontal, C)redondo.

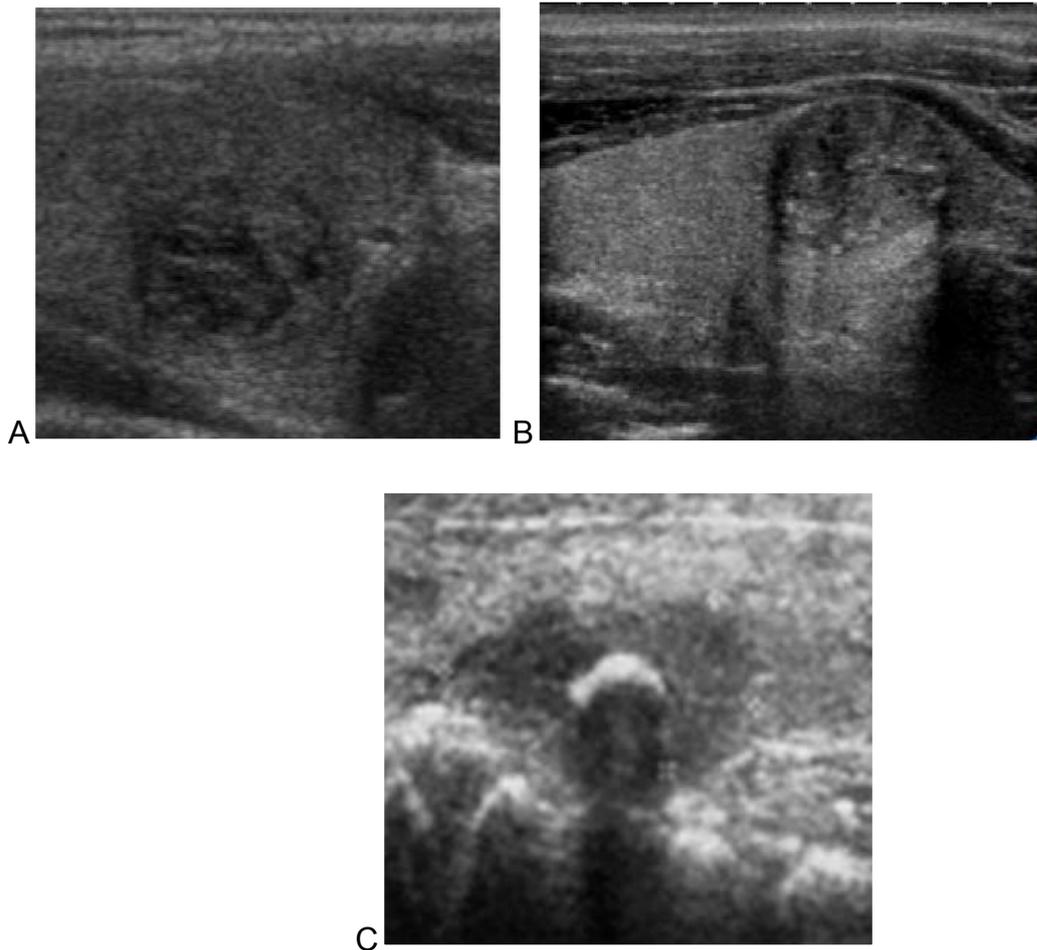


Figura 5. Parâmetros Ultrassonográficos: Calcificação dos Nódulos Tireoideanos - A)ausente, B)microcalcificação, C)macrocalcificação.

Os achados ultrassonográficos de nódulo tireoideano que sugerem benignidade são presença de halo uniforme, composição predominantemente cística, ausência de vascularização, e bócio multinodular (NACHIAPPAN et al., 2014). Já as características para suspeição de malignidade incluem: composição sólida, marcada hipoecogenicidade, microcalcificação, margens não circunscritas - irregular, microlobulada, infiltrativa (PARK et al., 2009), vascularização central (ROSÁRIO et al., 2013), diâmetro anteroposterior maior que o transversal, extensão extratireoidiana, associação com linfonodos cervicais atípicos e sombra acústica posterior (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014). A probabilidade de malignidade aumenta, com o aumento do número de achados suspeitos a ultrassonografia (KWAK et al., 2011).

As características ultrassonográficas de forma isolada não permite precisão em distinguir nódulos benignos e malignos, sendo a punção aspirativa com agulha fina (PAAF) o principal método para sua distinção (CHENG et al., 2013). A PAAF é

uma técnica percutânea utilizada para obtenção de espécime citológicas destes nódulos; podendo ser realizada através do método de palpação do nódulo ou guiada por USG, tendo esta última de maior acurácia (NACHIAPPAN et al., 2014).

Devido a alta prevalência de nódulos tireoidianos na população, não é viável a realização de PAAF em todos esses nódulos, fazendo-se necessário selecionar quais nódulos apresentam maiores riscos de malignidade, e, portanto, necessitam investigação adicional com intervenção (HORVATH et al., 2009).

Os critérios do consenso brasileiro para indicação de PAAF estão explicitados na tabela 1 (ROSÁRIO et al., 2013).

Tabela 1. Indicações de PAAF em pacientes com nódulo tireoidiano (Rosário et al.,2013).

Tamanho do nódulo	Indicação de PAAF
< 5mm	Não indicada
> ou = 5mm	Se alto risco clínico de malignidade ou nódulo suspeito na USG
> ou = 10mm	Nódulo sólido hipoecóico
> ou = 15mm	Nódulo sólido iso ou hiperecóico
> ou = 20mm	Nódulo complexo ou espongiforme
Sinais de invasão extratireoidiana	Todos
Linfonodos cervicais suspeitos na USG	Do linfonodo

Na tentativa de unificar os critérios de indicação de punção dos nódulos tireoidianos em todas as regiões, Horvath et al. (2009), criou um sistema de dados e relatório de imagem da tireoide, conhecido como TI-RADS (Thyroid Imaging Reporting and Data System). Nesse sentido, dez padrões de lesões tireoidianas foram descritas e classificadas em 6 categorias, permitindo estimar o risco de malignidade deste nódulo (HORVATH et al., 2009) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação TIRADS e Risco de Malignidade do Nódulo Tireoidiano (Horvath et al.,2009).

TIRADS	Classificação	Risco de Malignidade
1	Glândula tireoide normal	0%
2	Condições benignas	0%
3	Nódulo provavelmente benigno	<5%
4A	Nódulo de baixa suspeição	5-10%
4B	Nódulo de moderada suspeição	10-80%
4C	Nódulo de alta suspeição	10-80%
5	Nódulo provavelmente maligno	>80%
6	Nódulo com confirmação de malignidade por biópsia	100%

Posteriormente, essa classificação foi modificada, sendo acrescentando mais duas descrições de nódulos tireoidianos, totalizando doze perfis de lesões (PARK et al., 2009).

Uma única característica ultrassonográfica não permite segurança suficiente para distinguir entre lesões benignas e malignas da tireoide, porém a combinação de múltiplas características aumenta a sensibilidade e especificidade para estimar com maior precisão este risco (CHENG et al., 2013). Kwak et al. (2011), propôs estratificar os nódulos de acordo com a quantidade de características ultrassonográficas suspeitas, sendo selecionado cinco propriedades: a composição sólida, a hipoecogenicidade, a margem não circunscrita, o eixo verticalizado e a presença de microcalcificação como os atributos chaves. A categoria 3 representa o nódulo sem nenhum achado suspeito; 4A, uma suspeição; 4B, duas; 4C, três ou quatro; 5, cinco (KWAK et al., 2011).

Portanto, os nódulos estratificados em TIRADS 2, não necessitam realização de PAAF; assim como os TIRADS 3, que devem ser acompanhados, tendo indicação de intervenção caso o nódulo apresente crescimento, ou não seja possível realizar seguimento por imagem e em pacientes com alto risco clínico para malignidade. Os nódulos classificados como TI-RADS 4 e 5, tem indicação formal de serem biopsiados (HORVATH et al., 2009).

Quanto ao resultado citológico pós-punção, os nódulos tireoideanos podem ser classificados em seis categorias pelo sistema de laudo Bethesda. Como podemos observar na Tabela 3 e Figura 6 (CIBAS; ALI, 2009; NACHIAPPAN et al., 2014).

Tabela 3. Sistema Bethesda para laudos citopatológicos de tireoide (Cibas et al. 2009).

Categoria	Resultado
I	Amostra não diagnóstica ou insatisfatória
II	Benigno
III	Atipia com significado indeterminado ou Lesão folicular de significado indeterminado
IV	Neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular
V	Suspeito para malignidade
VI	Maligno

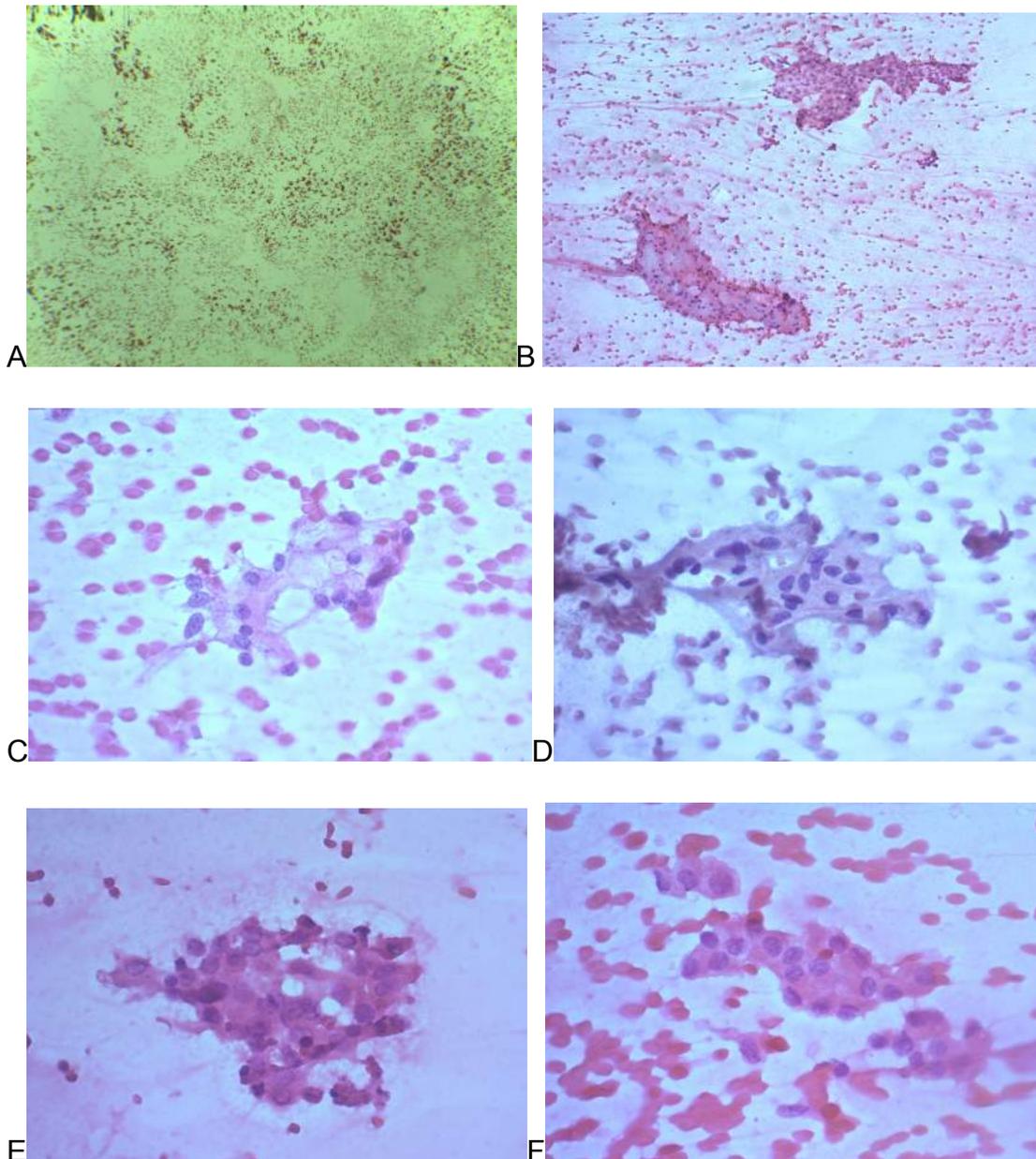


Figura 6. Classificação Bethesda: A) Bethesda I, 4x B) Bethesda II, 4x (Bócio Nodular) C) Bethesda II, 40x (Tireoidite Crônica) D) Bethesda III, 40x E) Bethesda V, 40x F) Bethesda VI, 40x.

Para a amostra citológica ser considerada satisfatória é necessário pelo menos seis conjuntos celulares, com cada grupo contendo no mínimo 10 células cada (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014).

Estão incluídos na categoria I: conteúdo líquido de cisto, espécime virtualmente acelular e amostras prejudicadas devido obscurecimento por sangue, esfregaço excessivamente grosso, secagem ao ar dos esfregaços e inadequada quantidade de células (CIBAS; ALI, 2009).

Os nódulos benignos incluem nódulo folicular benigno (nódulo adenomatóide, nódulo colóide), tireoidite linfocítica (Hashimoto) e tireoidite granulomatosa

subaguda. Já o nódulos malignos correspondem ao carcinoma papilífero, carcinoma pobremente diferenciado, carcinoma medular, carcinoma indiferenciado (anaplásico), carcinoma de células escamosas, carcinoma metastático e linfoma não-Hodgkin (CIBAS; ALI, 2009).

A partir do resultado citológico, definisse a conduta terapêutica para esses nódulos (ROSÁRIO et al., 2013). Os nódulos benignos apresentam tratamento conservador, com acompanhamento ultrassonográfico de controle (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014). Nódulos com amostra não diagnóstica, recomenda-se repetição da PAAF no intervalo de 3 a 6 meses, assim como os categorizados como III. Se persistir o resultado e houverem fatores de risco clínico ou ultrassonográfico ou dimensões maior que 2,0cm, a cirurgia está indicada, e caso nenhum desses critérios estejam presentes, deve ser acompanhado (ROSÁRIO et al., 2013). Nódulos classificados em Bethesda V e VI a cirurgia é indicada (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014), bem como também para os IV hipocapitantes a cintilografia (ROSÁRIO et al., 2013).

Uma das limitações da PAAF na definição diagnóstica do nódulo, ocorre naqueles que se classificam na categoria citológica III e IV, pois não é possível definir benignidade e malignidade destas lesões, porém estudos mais recentes através de imunologia podem ajudar nesta distinção (HORVATH et al., 2009).

A partir de amostras de tecidos coletados em biópsia ou cirurgia (imunohistoquímica) ou de células de um aspirado de punção ou esfregaço (imunocitoquímica), o estudo imunológico permite a pesquisa de um determinado antígeno, que pode ser uma proteína ou outra molécula específica, através do uso de anticorpos. As técnicas variam desde a direta, com a utilização de um único anticorpo (primária), até indireta, com o uso de dois ou três anticorpos (secundária e terciária), atuando para amplificar a reação (BRUCE, 2010; FILHO, 2006; LENZ, 1997).

2.3 Metaloproteinases de Matriz e seus Inibidores

A matriz extracelular (MEC) é fundamental para o desenvolvimento e a manutenção na arquitetura tecidual normal. A perda da integridade tecidual decorre da desintegração da MEC, o que ocorre em diversos processos patológicos, como na progressão tumoral. Existem várias famílias de enzimas degradadoras da MEC,

sendo a mais conhecida as metaloproteinases de matriz (MMP) (KRAIEM; KOREM, 2000).

A origem do nome “metalo” se deve a dependência do metal zinco para a atuação dessas enzimas proteolíticas (KHOKHA; MURTHY; WEISS, 2013), que apresentam capacidade de degradar componentes da matriz extracelular (CHOMAR et al., 2006; HOJILLA; MOHAMMED; KHOKHA, 2003; YADAV et al., 2014) e membrana basal (KRAIEM; KOREM, 2000). As MMPs são endopeptidases produzidas por uma variedade de células do organismo, entre elas, epiteliais, fibroblastos e inflamatórias. Estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, como remodelamento ósseo, implantação trofoblástica e patológicos, como invasão tumoral e doenças inflamatórias crônicas (RYDLOVA et al., 2008).

Atualmente, existem 23 tipos de MMPs encontradas em tecidos humanos (YADAV et al., 2014), que podem ser classificadas através de diversos sistemas, o mais inicial, baseado em sua especificidade pelo substrato da MEC, subdivide em seis grupos: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, tipo membrana e outras MMPs. Posteriormente, com o aumento dos substratos, surgiu o sistema numérico; e atualmente, basea-se na estrutura molecular, dividindo em oito classes, sendo cinco secretadas e três metaloproteinase de matriz tipo membrana (MT-MMP) (EGEBLAD; WERB, 2002; HOJILLA; MOHAMMED; KHOKHA, 2003) (Tabela 4).

Os componentes básicos presentes em todas as MMPs consistem em três domínios: uma sequência de sinal amino-terminal (Pre), que as direciona para o retículo endoplasmático; um domínio propeptídeo (Pro) com o zinco interagindo com o grupo tiol (SH), que confere a sua latência, e um domínio catalítico com também sítio de ligação ao zinco (Zn) (EGEBLAD; WERB, 2002) (Figura 7).

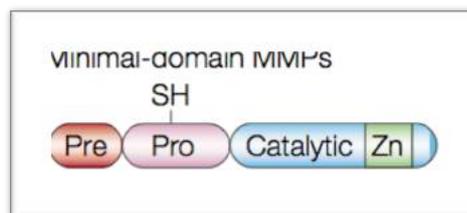


Figura 7. Estruturas básicas das metaloproteinases de matriz Catalytic= domínio catalítico, Pre= domínio propeptídeo, Pro= domínio propeptídeo, SH= grupo tiol, Zn= zinco (EGEBLAD; WERB, 2002), modificada.

Alguns membros possuem pequenas diferenças em sua estrutura, como o conjunto das gelatinases, as quais possuem três repetições de sítio semelhante a

fibronectina, permitindo sua ligação ao substrato gelatina (KHOKHA; MURTHY; WEISS, 2013) (Figura 8). Este grupo é formado por duas moléculas, a gelatinase A, também conhecida como MMP-2, e a gelatinase B, MMP-9 (CHO MAR et al., 2006; EGEBLAD; WERB, 2002; MAETA; OHGI; TERADA, 2001). A primeira age na MEC degradando gelatina, colágeno tipo I, IV, V, VI, VII e X, fibronectina, elastina e laminina; e a segunda, gelatina, colágeno tipo IV, V, VII, X e XIV, elastina, fibrilina e osteonectina (STERNLICHT, 2001; YADAV et al., 2014).

Tabela 4. Principais metaloproteínas e seus substratos (EGEBLAD; WERB, 2002; OVERALL; KLEIFELD, 2006; STERNLICHT, 2001; VIDAL et al., 2011; YADAV et al., 2014).

Metaloproteína	Classe	Principais Substratos
MMP-1	Colagenase-1	Colágeno I, II, III, VII e X, Gelatina, Entatina, Proteína Ligante, Agrecano, Tenascina, L-selectina, Proteína de ligação ao IGF, ProMMPs-2 e 9
MMP-2	Gelatinase A	Gelatina, Colágeno tipo I, IV, V, VI, VII e X, Fibronectina, Elastina e Laminina
MMP-3	Estromelisina-1	Proteoglicano, Laminina, Fibronectina, Gelatina, Colágeno III, IV, V, IX, X e XI, Proteína Ligante, Fibrina, Entatina, Tenascina, Vitronectina, ProMMPs-1,8,9 e 13
MMP-7	Matrilisina	Proteoglicano, Laminina, Gelatina, Colágeno IV, Entatina, Fibronectina, Proteína Ligante, Vitronectina, Elastina, Tenascina, Fibulina, ProMMPs-1, 2 e 9
MMP-8	Colagenase-2	Colágeno I, II e III, Gelatina, Agrecano
MMP-9	Gelatinase B	Gelatina, Colágeno tipo IV, V, VII, X e XIV, Elastina, Fibrilina e Osteonectina
MMP-10	Estromelisina-2	Proteoglicano, Laminina, Gelatina, Elastina, Colágeno III, IV, V e IX, Fibronectina, Proteína Ligante, ProMMP-1
MMP-11	Estromelisina-3	Laminina, Fibronectina, Agrecano, Alfa1-PI, Alfa2-macroglobulina
MMP-12	Metaloeslastase	Elastina, Fibrinogênio, Fibronectina, Laminina, Proteoglicanos, Entatina, Colágeno IV, IgGs, Proteína básica da mielina, Plasminogênio, Alfa-1-PI
MMP-13	Colagenase-3	Colágeno I, II, e III, Gelatina, Agrecano
MMP-14 (MT1-MMP)	Transmembrana	Colágeno I, II e III, Gelatina, Fibronectina, Laminina, Vitronectina, Proteoglicano, ProMMPs -2 e 13, Alfa1-PI, Alfa2-macroglobulina, CD44
MMP-15 (MT2-MMP)	Transmembrana	Pro-MMP-2, Transglutaminase de superfície
MMP-16 (MT3-MMP)	Transmembrana	Pro-MMP-2, Colágeno III, Fibronectina, Trnasglutaminase de superfície
MMP-17 (MT4-MMP)	Transmembrana	Fibrina
MMP-18	Colagenase-4	Colágeno I, Gelatina
MMP-19	RASI-1	Colágeno I
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina, Agrecano
MMP-21	XMMP	Gelatina
MMP-23	CA-MMP	Gelatina
MMP-28	Epilisina	Caseína

As MMPs são sintetizadas sob a forma latente, e secretadas sob a forma inativa, pro-enzima (pro-MMP), necessitando de ativação proteolítica para se tornarem ativas (RYDLOVA et al., 2008). A única exceção a essa forma, são as classificadas como “Tipo Membrana” (MT-MMP) (KRAIEM; KOREM, 2000), que não são secretadas, permanecendo ligadas a superfície celular (RYDLOVA et al., 2008). Podem ser ativadas pela ação de proteases dos tecidos ou plasma, de outras MMPs ou de proteases de serina (HOJILLA; MOHAMMED; KHOKHA, 2003).

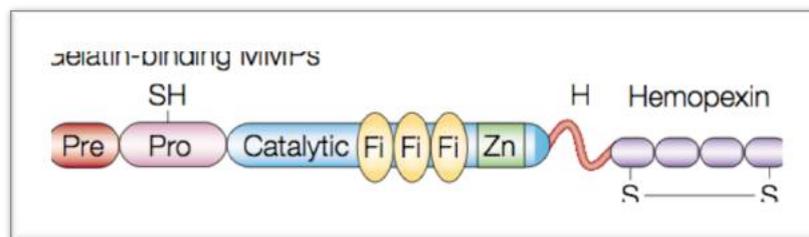


Figura 8. Estrutura protéica das gelatinases. Catalytic= domínio catalítico, Fi= fibronectina, Pre= domínio prepeptídeo, Pro= domínio pró-peptídeo, SH= grupo tiol, Zn= zinco (EGEBLAD; WERB, 2002), modificada.

A ativação da pro-MMP-2 depende da ação proteolítica da MT-MMP, como MT2, MT3 e, principalmente do MT1, isolada ou ligada ao inibidor tecidual das metaloproteinase (TIMP) tipo 2. Já a MMP-9, tem como ativadores de sua forma latente proteinases séricas como, plasmina, ativador do plasminogênio, elastase e tripsina, além de outras MMPs, como MMP-3 e a própria MMP-2 (CHO MAR et al., 2006; MAETA; OHGI; TERADA, 2001; STERNLICHT, 2001).

A atividade proteolítica das MMPs pode ser regulada por diversos inibidores fisiológicos, tanto específicos, como não específicos (HOJILLA; MOHAMMED; KHOKHA, 2003). Dentre esses últimos, pode-se citar a alfa2-macroglobulina, uma abundante proteína do plasma, a qual age acoplando-se as MMPs, e este complexo liga-se a receptores depuradores, provocando sua endocitose, promovendo uma inibição irreversível. A trombospondina 1 e 2 também apresentam capacidade de inativar as MMPs, a primeira agindo semelhante a alfa2-macroglobulina, e a segunda atuando de forma direta (EGEBLAD; WERB, 2002).

A inativação específica ocorre através das TIMPs, família formada por quatro membros, enumerados de 1 a 4. Eles se ligam a um dos sítios de atividade do zinco das MMPs, produzindo um complexo inibitório (KRAIEM; KOREM, 2000), de forma

reversível, numa proporção de 1 TIMP para 1 MMP. Outras pequenas moléculas que apresentem domínios semelhantes aos do TIMP - tal qual domínio NC1 do colágeno tipo IV - assim como a proteína indutora de reversão rica em cisteína com motivos Kazal (RECK) podem também atuar como inibidores (EGEBLAD; WERB, 2002; HOJILLA; MOHAMMED; KHOKHA, 2003).

Além da ativação e da inibição das MMPs, outro mecanismo regulatório de sua expressão se deve a transcrição genética. Duas moléculas atuam na transcrição da MMP, a interleucina-1beta (IL-1 β) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), a primeira atua estimulando, e a segunda inibindo a expressão do gene (YADAV et al., 2014).

O conceito inicial dos TIMPs é de que sua superprodução pode prevenir a degradação da MEC, e assim, reduzir o grau de invasão tumoral. Entretanto, paradoxalmente, outros estudos identificaram um pobre prognóstico nos tumores malignos com elevado nível de TIMP. Esses resultados provavelmente são provenientes dos outros efeitos biológicos dessas proteínas, como dos TIMP-1 e TIMP-2, os quais apresentam atividade promotora de crescimento. Outros efeitos relacionados ao TIMP-1 é a propriedade antiangiogênica; e ao TIMP-2, a ativação da pro-MMP2 (KRAIEM; KOREM, 2000). A TIMP-1 preferencialmente age sobre a MMP-9, e a TIMP-2 sobre a MMP-2 (MAETA; OHGI; TERADA, 2001). A elevada expressão de TIMP-2 em lesões malignas, indica presença de ativação da MMP-2 (CHO MAR et al., 2006).

O aumento do nível de MMPs está presente em diversos processos tumorais, estando diretamente relacionado ao grau de progressão do tumor; pacientes que apresentam alta razão MMP/TIMP tendem a evoluir com recorrência precoce e curso clínico da doença com maior agressividade (KRAIEM; KOREM, 2000). Compreender o comportamento dessas MMPs em nódulos tireoidianos pode corroborar na avaliação diagnóstica e na elaboração de um indicador prognóstico da evolução clínica. Assim como estudar o uso dessas proteínas como alvos terapêuticos, uma vez que a inibição das MMPs pode, teoricamente, modular os processos de digestão da MEC dificultado os processos de invasão e metástases (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão das MMP-2 e MMP-9, e TIMP-2, através da imunocitoquímica, em nódulos tireoideanos submetidos a punções citológicas em pacientes previamente diagnosticados pela ultrassonografia da tireoide.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o perfil epidemiológico dos pacientes portadores de nódulos tireoideanos em Pernambuco;
- Estabelecer associação entre este perfil com os resultados citológicos dos nódulos.
- Verificar as associações entre achados ultrassonográficos dos nódulos tireoideanos e os resultados citológicos;
- Aplicar os critérios do TI-RADS aos nódulos tireoideanos estudados e confrontar com os achados das análises citológicas, para validação desta classificação;
- Estabelecer as associações entre a expressão de MMP e TIMP e os resultados citológicos dos nódulos tireoideanos;
- Analisar as correlações da expressão das MMPs como potencial marcadores diagnósticos das neoplasias tireoidianas;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

O estudo foi realizado através do método prospectivo, observacional, analítico e transversal.

4.2 Local de Coleta das Amostras

As amostras foram coletadas no departamento de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, no setor de Ultrassonografia, e no departamento de Patologia, do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.3 População Alvo e Período

O estudo teve a participação de 135 pacientes voluntários com lesão nodular, única ou múltipla, totalizando 230 nódulos da glândula tireoide, incluindo natureza benigna ou maligna, atendidos no HC da UFPE, encaminhados dos diversos setores clínicos do hospital para a realização de PAAF destes nódulos.

O período de coleta de dados foi de Maio 2015 a Maio 2016.

4.4 Critérios de Inclusão

- Pacientes com resultados de exame imaginológico apresentando possíveis lesões nodulares da glândula tireoide, confirmado pelo estudo citopatológico;
- Resultado citológico satisfatório.

4.5 Critérios de Exclusão

- Pacientes com recusa a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).
- Pacientes com amostras citológicas não diagnósticas ou insatisfatórias (Classificação Bethesda I)

4.6 Triagem dos Pacientes no HC

No primeiro atendimento foi colhida a história do paciente, com posterior análise dos exames de imagem e laboratorial disponibilizados. Em seguida foi preenchido um questionário padronizado (anexo I).

4.6.1 Coleta Citológica – PAAF

No setor de ultrassonografia do departamento de Diagnóstico por imagem, os voluntários foram atendidos por médico radiologista com experiência na área.

O paciente recebeu todas as orientações referentes ao exame, e após o consentimento, iniciou-se o estudo. Primeiramente, foi realizada uma varredura ultrassonográfica da região cervical, através de transdutores lineares de alta frequência, de 5-12 megahertz (aparelhos GE LOGIQ P6 e PHILLIPS ENVISOR) para confirmar a presença dos nódulos, e quando presentes foram selecionados os nódulos maiores que 1,0cm de diâmetro e nódulos menores que 1,0cm que apresentassem características suspeitas clínicas ou ultrassonográficas.

Antes da punção, a região cervical era submetida a assepsia com álcool 70% e/ou solução degermante de clorexidina a 2%. A PAAF guiada por USG foi realizada com agulha fina de calibre 22G ou 23G, de acordo com disponibilidade no serviço. Parte do material aspirado na seringa foi lavado cinco vezes, aspirando e expelindo, com 8ml de solução preservante em meio líquido (*Liqui-PREP Cytology & Special Processing Systems - Preservative Solution*) e armazenado em frasco estéril para posterior análise imunocitoquímica (ICQ); e a outra parte foi utilizada para confecção de esfregaço em lâminas de vidro de microscópio, fixadas em álcool absoluto, e encaminhadas para o setor de anatomia patológica do hospital, para avaliação citológica por médico patologista com experiência na área.

4.6.2 Resgate dos Laudos Citológicos

Os laudos citológicos das punções dos nódulos tireoideanos foram resgatados no setor de patologia deste mesmo hospital.

4.7 Aspectos Éticos da Pesquisa

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), com aprovação de CAAE 47863515.0.0000.5208. Obedeceu integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os pacientes e familiares que, após informações, concordaram em participar da pesquisa, assinaram o TCLE.

Os participantes com idade inferior a 18 anos, tiveram consentimentos dos pais e responsáveis para participar do estudo.

A identidade dos participantes foi mantida em sigilo absoluto e o projeto não interferiu nos procedimentos de rotina do serviço.

4.8 Análises Laboratoriais: Imunocitoquímica

A avaliação laboratorial foi realizada no Laboratório de Pesquisa Citológicas e Moleculares (LPCM) do Centro de Biociências (BC) da UFPE.

As análises ICQs para as proteínas MMP-2, MMP-9, TIMP-2 foram realizadas em material aspirado através da PAAF no serviço de radiologia. O material inicialmente armazenado em solução preservante de meio líquido (*LiquiPREP cytology processing kit – Preservatite Solution*, marca Sirius), foi enviado ao laboratório onde ficou armazenado em geladeira a aproximadamente 4°C até o momento da análise.

Para o preparo das lâminas as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado, restando apenas o *pellet* celular. Ao *pellet* foi adicionada a solução que promove aderência a lâmina (*LiquiPREP Cellular Base Solution*), sendo homogeneizada em vórtex. Alíquotas de cerca de 20 microlitros dessa suspensão foram colocadas nas lâminas de vidro silanizadas, posteriormente, foram secas e processadas.

O protocolo usado na ICQ foi o descrito pelo fabricante do kit de detecção *reveal* (SPD 125, *Spring bioscience*). As lâminas foram banhadas em álcool 100%, 70% e água destilada durante 5 minutos respectivamente cada. Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica. As lâminas foram incubadas em tampão com citrato por 30 minutos no *steamer*, posteriormente, resfriadas em temperatura ambiente e lavadas com água destilada. O bloqueio foi realizado utilizando a peroxidase endógena durante 30 minutos com a solução contida no kit (*Hydrogen Peroxide Block*) e depois as lâminas foram lavadas novamente com água destilada e tampão fosfato salino (PBS).

O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com a solução específica do kit (*Protein block*) durante 30 minutos. Posteriormente as lâminas foram incubadas, em câmara úmida *overnight* sob refrigeração de 4°C, com o anticorpo primário de rato, monoclonal, IgG MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, conforme

especificações na tabela 5. Como diluente foi utilizado o anticorpo Spring – ADS 125.

Tabela 5. Especificações dos Anticorpos para imunocitoquímica.

ANTICORPO	NÚMERO	LOTE	MARCA	DILUIÇÃO
MMP-2	53630	E0211	Santa Cruz	1:400
MMP-9	21733	A0314	Santa Cruz	1:200
TIMP-2	21735	K231	Santa Cruz	1:400

Em seguida, o material foi lavado com PBS, para retirada do excedente do anticorpo no material, e incubado com o anticorpo secundário contido no kit (*reveal complement*) por 30 minutos, e em seguida com o anticorpo terciário (*reveal HRP*) também por 30 minutos, ambos em câmara úmida, sob temperatura ambiente (20-25°C).

Após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o revelador diaminobenzidina (DAB) (presente no mesmo kit) por 5 minutos, e contracoradas com hematoxilina de Harris para evidenciar os núcleos das células. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, seguida de banhos em solução alcoólica crescente (70 e 100%) por 5 minutos cada. Ao final, foram emergidas no xilol e montadas com entellan e lamínulas, para posterior análise microscópica.

4.9 Análise Computadorizada de Imagens

A análise das células marcadas foi aferida utilizando microscópio *Zeiss AxioCam* e sistema de captura de imagens *Zen Blue edition 2011*, disponíveis no LPCM, sendo realizada pela equipe deste laboratório. Utilizou-se o parâmetro de quantificação manual celular, sendo considerado reação negativa quando menos de quatro células foram marcadas, e positiva, quando este número ultrapassou o limite de quatro.

4.10 Análise Estatística

Foi realizado avaliação pelo teste qui-quadrado e razão de possibilidade através do *software* MEDCALC® (*Panmun Education, Seoul, Republic of Korea*), para as variáveis categóricas epidemiológicas e para os parâmetros ultrassonográficos, conforme descrito na tabela 6 e 7, assim como para a

classificação TIRADS 2, 3 e 4, e para a expressão das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2.

Tabela 6. Parâmetros das variáveis categóricas epidemiológicas.

VARIÁVEL	PARÂMETROS
Sexo	Feminino x masculino
Idade	> 45 anos x < 45 anos
Raça	Pardo / Branco, / Negro / Índigena / Amarelo
IMC	Elevado (sobrepeso e obesidade) x Não elevado (normal e baixo peso)
Escolaridade	Baixa (instrução inferior ao ensino médio) x Alta (instrução maior ou igual ao nível médio completo)
Tabagismo	Sim x Não
Etilismo	Sim x Não
História Familiar	Sim x Não
Cirurgia Tireoide	Sim x Não
Medicação	Sim x Não
Iodo Radioativo	Sim x Não

* IMC = Índice de Massa Corpórea

Tabela 7. Parâmetros das variáveis categóricas ultrassonográficas.

VARIÁVEL	PARÂMETROS
Composição	Sólido x Não-sólido (misto e cístico)
Ecogenicidade	Hipoecóica x Não-hipoecóica
Margens	Circunscrita x Não-circunscrita
Eixo	Paralelo x Não-paralelo
Calcificação	Presente x Ausente
Tamanho	> 2cm x < 2 cm
Halo hipoecóico	Presente x Ausente
Colóide espesso	Presente x Ausente

Considerou-se o intervalo de confiança (IC) de 95% e *p-valor* < 0.05, e todas as análises foram realizadas pelo site <http://www.waent.org/Chi-Square-Test.htm> e https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php.

Estudado ainda através de análise de regressão logística a expressão dos anticorpos para MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, e comparado com os resultados citológicos da classificação Bethesda, sendo utilizado o mesmo IC e *p-valor*.

5 RESULTADOS

Os 135 pacientes do estudo, com 230 nódulos tireoideanos diagnosticados por imagem, foram submetidos a PAAF guiada por USG. Destes, 45 pacientes e 110 nódulos foram excluídos do estudo por apresentarem resultados citológicos Bethesda I.

5.1 Resultados Citológicos

Os 90 pacientes incluídos no estudo apresentavam pelo menos um nódulo tireoideano com resultado satisfatório a punção, sendo 68 com apenas um nódulo (75,55%), 15 com dois nódulos (16,66%) e seis com três nódulos (6,67%) e um com quatro nódulos (1,11%), totalizando 120 nódulos.

Os nódulos estudados foram distribuídos em 6 categorias, de acordo com a classificação citológica de Bethesda (vide tabela 3). Noventa nódulos exprimiram benignidade (Bethesda II), sendo incluídos neste grupo bócio nodular, cisto colóide, nódulo folicular benigno e tireoidite crônica, sendo nove pertencentes a esse último diagnóstico. Quinze (12,5%) tiveram natureza indeterminada (Bethesda III), seja atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado. Neoplasia folicular esteve presente em apenas uma (0,83%) das lesões (Bethesda IV); e nódulos com suspeita de malignidade em apenas duas (1,66%) (Bethesda V). A malignidade foi diagnosticada em 12 lesões, 10% (Bethesda VI), destes somente um caso de carcinoma pouco diferenciado do tipo anaplásico (8,33%), e os restantes representados por carcinoma papilífero (91,66%), com ou sem variante folicular e diferenciação oncocítica (tabela 08). Nenhum caso de carcinoma medular foi identificado no estudo.

Dentre os nódulos malignos, 58% ocorreram em indivíduos com apenas uma lesão e 32% em pacientes com mais de um nódulo; apenas um paciente (10%) apresentou mais de uma lesão maligna na glândula, com três nódulos.

Tabela 8. Resultado citológico dos nódulos tireoideanos.

Categoria Bethesda	Resultados
II – Bócio Nodular	81 (67,5%)
II – Tireoidite	09 (7,5%)
III	15 (12,5%)
IV	01 (0,83%)
V	02 (1,66%)
VI – Anaplásico	01 (0,83%)
VI – Papilífero	11 (9,16%)

5.2 Perfil Epidemiológico

Dos 90 pacientes incluídos no estudo, a maioria, 83 (92%) foram do gênero feminino, e apenas sete do masculino (8%), assim como no grupo com apenas nódulos malignos, em que dois são homens (20%) e oito (80%) mulheres. Entretanto, quando se considera a proporção de analisados, 28,6% dos pacientes masculinos apresentaram câncer, contra apenas 9,6% dos femininos. Apesar de observado um fator de risco de quase quatro vezes mais de malignidade entre os homens, essa diferença não foi significativa estatisticamente (OR=3.7500, IC 0.0443-1.6045, $p=0.1489$).

A idade dos participantes do estudo variou entre 15 e 81 anos, com média de 51,6 anos. Os pacientes foram divididos em 3 grupos, prevalecendo no estudo os pacientes adultos maduros e idosos, com faixa etária acima dos 45 anos, correspondendo a 63 estudados (70%). Os demais grupos foram: crianças e adolescentes, um paciente com idade abaixo de 18 anos (1,11%); e 26 adultos jovens, entre 18 e 45 anos (28,88%). Entre os enfermos com câncer, apenas um (10%) possuía idade inferior a 45 anos. Foi observado um fator de risco de 4,3 vezes maior de neoplasia de tireoide quando ultrapassado o limite de 45 anos, porém sem valores significantes estatisticamente (OR=4.333, IC 0.5210-36.0415, $p=0.1749$).

Quanto a etnia, a mais prevalente foi a parda, com 54 pacientes (60%); um paciente não respondeu ao questionário (1,11%); os demais se intitularam como branco, 25 (27,78%); negro, oito (8,89%) e amarelo, dois (2,22%). Nenhum paciente indígena participou do estudo (0%). Dos dez pacientes com malignidade, sete (70%) são pardos, e os demais brancos. Nenhum paciente negro ou amarelo apresentou câncer. Não houve significância estatística na análise da raça nesta pesquisa (pardo/branco OR=1.0922, IC=0.2577-4.6292, $p=0.9047$; negro/não-negro OR=0.4062, IC=0.0218-7.5664, $p=0.5460$).

Avaliando-se a procedência, a maioria dos pacientes, 46 (51%), foram de Recife e região metropolitana (Jaboatão dos Guararapes, Paulista, Igarassu, Abreu e Lima, Camaragibe, Cabo de Santo Agostinho, São Lourenço da Mata, Araçoiaba, Ilha de Itamaracá, Ipojuca, Moreno, Itapissuma); apenas um paciente teve origem de outro estado (1%); e os demais, 43 (48%), foram oriundos do interior do Estado de Pernambuco. Dentre os malignos, seis (60%) são do interior e quatro (40%) da capital e adjacências (OR=1.7027, IC=0.4458-6.5036, $p=0.4363$).

Na escolaridade, predominou os indivíduos com baixa escolaridade no estudo. Os pacientes foram categorizados em: analfabeto, três (3,33%) (n=03), ensino fundamental incompleto, 43 (47,77%), fundamental completo, cinco (5,55%), médio incompleto, oito (8,88%), médio completo, 25 (27,77%) (n=25), superior incompleto, dois (2,22%), superior completo, três (3,33%) e um avaliado (1,11%) não informou seu grau de instrução. Não se observou estatisticamente relação entre escolaridade e risco de malignidade (OR=0.4554, IC = 0.0904-2.2932, $p=0.3402$).

Dentre os analisados, a maior parte, 79 (87,77%) e 76 (84,44%) não tinha hábitos como tabagismo e etilismo, respectivamente. Cinco pacientes eram ex-tabagistas (5,55%), um ex-etilista (1,11%) e dois paciente não responderam, um sobre vício de cigarro (1,11%) e um sobre bebida (1,11%). A carga tabagística e etilística não foi avaliada. Entre os doentes com câncer, oito eram não-tabagista (80%) e sete não-etilista (70%). Ainda que o risco de malignidade tenha sido maior entre os tabagistas (OR=2.2188) e etilistas (OR=1.7922), não se observou significância (IC=0.4000-12.3076, $p=0.3619$; IC=0.3289-9.7658, $p=0.5000$, respectivamente).

Através do cálculo do IMC, obtidos pela altura em metros (A) e peso em quilos (P) dos estudados ($IMC = P/A^2$), os participantes foram classificados em: IMC menor que 18,5 (baixo peso), entre 18,5-24,9 (normal), entre 25-29,9 (sobrepeso); e maior ou igual a 30 (obesidade), observando-se que a maior percentagem dos estudados, 51 (56,66%), encontrava com o peso acima da normalidade; destes, 28 com sobrepeso (31,11%) e 23 com obesidade (25,55%). Os obesos ainda foram subdivididos em: obesidade grau I (30-34,9), 18 (20%); grau II (35-39,9), quatro (4,44%) e grau III (≥ 40), um (1,11%). Treze (14,44%) avaliados não informaram seu peso e/ou altura; 24 encontram-se com peso ideal (26,66%); e dois, com baixo peso (2,22%). Entre os pacientes que informaram peso e altura (n=77), detectou-se que 51 (66,2%) destes estavam com IMC acima da faixa na normalidade; assim como

sete (70%) dos pacientes com malignidade (OR=1.9091, IC=0.3673-9.9240, $p=0.4420$).

Apenas nove estudados (10%) apresentaram história familiar de câncer de tireoide, porém não souberam informar qual tipo histológico. Entretanto, um único portador de malignidade (10%) tinha este histórico, apresentando citologia para carcinoma papilífero variante folicular (OR=1.0, IC=0.1118-8.9473, $p=1.0000$).

A minoria dos pacientes, quatro (4,44%), relataram cirurgia prévia da tireoide, com tireoidectomia parcial, entretanto, não disponibilizaram laudos histológicos ou relatos cirúrgicos prévios. Entre eles, apenas uma confirmou malignidade (25%), porém, considerando os doentes com câncer, apenas um (10%) informou precedente cirúrgico da glândula (OR=2.7407, IC=0.2571-29.2199, $p=0.4037$).

Como a maioria dos analisados não disponibilizaram os exames laboratoriais no momento da punção, a avaliação da função tireoideana ficou prejudicada, no entanto, foi realizada avaliação superficial, baseada na utilização de medicações específicas. Vinte e dois pacientes fazem uso de medicação para tratamento de hipotireoidismo (16,3%); um, para tratamento de hipertireodismo (0,74%); e dois (1,48%) não souberam informar qual remédio utilizava. Com malignidade citológica confirmada, quatro pacientes se medicavam especificamente para tireoide, três com reposição hormonal devido a baixa função da glândula, e um não especificou a finalidade; não se evidenciou significância (OR=1.8095, IC=0.4642-7.0539, $p=0.3929$).

Pequeno percentual dos entrevistados, 3,33% (n=03), tiveram passado de tratamento tireoideano com iodo radioativo, e somente um destes foi diagnosticado com câncer (carcinoma papilífero de tireoide); os outros dois eram portadores de tireoidite crônica. Afora risco quatro vezes maior de câncer observado nestes pacientes, não foi possível estabelecer resultados estatísticos (OR=4.2778, IC=0.3519-52.0008, $p=0.2541$).

Tabela 9. Resultado do perfil epidemiológico dos pacientes com nódulos tireoideanos.

Parâmetro		Resultados
Sexo	Feminino	83 (92%)
	Masculino	07 (8%)
Idade	<18 anos	01 (1,11%)
	18-45 anos	26 (28,88%)
	>45 anos	63 (70%)

Etnia	Parda	54 (60%)
	Branco	25 (27,78%)
	Negro	08 (8,89%)
	Amarelo	02 (2,22%)
	Indígena	0 (0%)
	Não respondeu	01 (1,11%)
Procedência	RMR	46 (51%)
	Interior	43 (48%)
	Outro Estado	01 (1%)
Escolaridade	Analfabeto	03 (3,33%)
	Fund. Incompleto	43 (47,77%)
	Fund. Completo	05 (5,55%)
	Médio Incompleto	08 (8,88%)
	Médio Completo	25 (27,77%)
	Superior Incompleto	02 (2,22%)
	Superior Completo	03 (3,33%)
	Não respondeu	01 (1,11%)
Tabagismo	Sim	05 (5,55%)
	Ex-tabagista	05 (5,55%)
	Não	79 (87,77%)
	Não respondeu	01 (1,11%)
Etilismo	Sim	12 (13,33%)
	Ex-etilista	01 (1,11%)
	Não	76 (84,44%)
	Não respondeu	01 (1,11%)
IMC	< 18,5	02 (2,22%)
	18,5-24,9	24 (26,66%)
	25-29,9	28 (31,11%)
	> 30	23 (25,55%)
	Não respondeu	13 (14,44%)
Hist. Familiar Ca.	Sim	09 (10%)
	Não	81 (90%)
Cirurgia	Sim	04 (4,44%)
	Não	86 (95,56%)
Medicação	Hipotireoidismo	22 (16,3%)
	Hipertireoidismo	01 (0,74%)
	Não sabe medicação	02 (1,48%)
	Não	75 (81,48%)
Iodo Radioativo	Sim	03 (3,33%)
	Não	87 (96,67%)

5.3 Resultados Ultrassonográficos

Os 120 nódulos avaliados, foram divididos em quatro grupos: menores 1,0cm, entre 1,0 cm e 1,9cm, entre 2,0cm e 2,9cm e maior ou igual a 3,0cm, com respectivamente quatro lesões (3,33%), 75 (62,5%), 22 (18,33%) e 19 (15,83%). O

diâmetro médio das lesões foi de 2,07cm, variando de 0,6cm a 7,2cm. Dentre os nódulos com Bethesda maior ou igual a IV, a maioria, sete (46,7%), apresentavam dimensões entre 1,0-1,9cm. Porém, não foram considerados significantes estatisticamente (OR=0.410, IC=0.1342-1.1986, $p=0.1019$, para nódulos <2,0cm).

A maior parte dos nódulos foram classificados como nódulos mistos, 79 (65,84%), e apenas 35 (29,16%) com composição sólida e seis (5%) puramente cístico. Estes últimos, todos tiveram citologia benigna (OR=4.6923, IC=0.2566-85.8036, $p=0.2971$); enquanto que dois (100%) dos nódulos Bethesda V e sete (58%) dos Bethesda VI eram sólidos. Quando comparado o risco de malignidade entre nódulos com composição sólida e não sólida (mistos e císticos), houve uma maior chance naqueles com Bethesda \geq IV (OR=4.5577, IC=1.4811-14.0254, $p=0.0082$), assim como nos exclusivamente Bethesda VI (OR=4.0, IC=1.1742-13.6262, $p=0.0266$).

Na ecogenicidade, 39 nódulos mostraram-se como hipoecóicos (32,5%), 52 isoecóicos (43,34%), 11 hiperecóicos (9,16%), 05 anecóicos (4,16%) e 13 heterogêneos (10,84%). Todos os nódulos anecóicos e dez (90,9%) dos hiperecóicos foram benignos. Nenhuma lesão hiperecócica ou anecócica exibiu citologia para malignidade; entretanto, 66% dos Bethesda VI exprimiram hipoecogenicidade, e 83,33% considerando os heterogêneos predominantemente hipoecóicos neste grupo. O risco de malignidade também foi verificado na análise entre nódulos hipoecóicos e não-hipoecóicos, para Bethesda \geq IV e para os VI (OR=3.7500, IC=1.2279-11.4521, $p=0.0203$; OR=4.9677, IC=1.3943-17.6999, $p=0.0134$). Apesar do nódulo anecócico ter chance cerca de quarto vezes mais de ser benigno, o resultado não foi estatisticamente significativo (OR=3.9240, IC=0.2107-73.0819, $p=0.3595$), ocorrendo o mesmo para hiperecogenicidade (OR=3.6250, IC=0.4443-29.5759, $p=0.2292$).

Considerando as margens dos nódulos, estes foram divididos em dois conjuntos, circunscritos perfazendo 110 (91,66%), e não circunscrito, dez (8,34%), com quatro (40%) deste último denotando malignidade no esfregaço (OR=6.0, IC=1.4645-24.5810, $p=0.0128$ para Bethesda \geq IV; e OR=8.5, IC=1.9829-36.4369, $p=0.0040$ para os VI).

Já analisando o eixo, 117 (97,5%) são paralelos, e apenas três, não paralelo (2,5%), com todos deste apontando natureza maligna (OR=59.0800, IC=2.8812-

1211.4558, $p=0.0081$ para Bethesda \geq IV; e $OR=79.9474$, $IC=3.8375-1665.5492$, $p=0.0047$ para os VI).

A característica calcificação foi ausente em 94 nódulos (78,33%) e presente em 26 (21,67%), sendo esta classificada em macrocalcificação em 21 (17,5%), e microcalcificação em quatro (3,33%); apenas um nódulo apresentou ambos os tipos de calcificação (0,83%). A presença de microcalcificação foi critério de malignidade em 100% dos nódulos ($OR=110.5238$, $IC=5.7057-2140.9488$, $p=0.0019$ para Bethesda \geq IV; $OR=159.1333$, $IC=8.0169-3158.7593$, $p=0.0009$). Entretanto, macrocalcificação foi critério de benignidade apenas em doze casos (57,1%) ($OR=0.3077$, $IC=0.1164-0.8137$, $p=0.0175$).

Além dos cinco parâmetros principais, outras variáveis presentes em exames de imagem também foram analisadas, como foco ecogênico de coloide espesso e fino halo hipoecóico periférico, observados respectivamente em 7,5% ($n=08$) e 20,83% ($n=25$) das lesões. Nenhum dos nódulos com foco ecogênico de coloide ou com halo hipoecóico apresentou citologia Bethesda VI. Na estimativa de benignidade, não foram alcançados resultados significantes ($OR=3.2222$, $IC=0.3856-26.9286$, $p=0.2801$; e $OR=0.8214$, $IC=0.3048-2.2135$, $p=0.6973$).

Tabela 10. Resultado dos aspectos ultrassonográficos dos 120 nódulos tireoideanos puncionados.

Parâmetro	Resultados	
Tamanho	< 1,0cm	04 (3,33%)
	1,0-1,9cm	75 (62,5%)
	2,0-2,9cm	22 (18,33%)
	> 3,0cm	19 (15,83%)
Composição	Misto	79 (65,84%)
	Sólido	35 (29,16%)
	Cístico	06 (5%)
Ecogenicidade	Isoecóico	52 (43,34%)
	Hipoecóico	39 (32,5%)
	Hiperecóico	11 (9,16%)
	Anecóico	05 (4,16%)
	Heterogêneo	13 (10,84%)
	Margens	Circunscrito
	Não circunscrito	10 (8,34%)
Eixo	Paralelo	117 (97,5%)
	Não paralelo	03 (2,5%)
Calcificação	Ausente	94 (78,33%)

	Macrocalcificação	21 (17,5%)
	Microcalcificação	04 (3,33%)
	Macro & Micro	01 (0,83%)
Halo hipoecóico	Sim	25 (20,83%)
	Não	65 (79,17%)
Colóide espesso	Sim	08 (7,5%)
	Não	72 (92,5%)

De acordo com a classificação TIRADS, foram encontrados cinco nódulos (4,16%) TIRADS 2, 56 (46,6%) 3, 38 (31,66%) 4A, 15 (12,5%) 4B, seis (5%) 4C e nenhum (0%) 5. Todas as lesões da categoria 2 foram benignas (OR=3.9240, IC=0.2107-73.0819, $p=0.3595$), assim como 48 (85,7%) das da 3 (OR=3.1429, IC=1.2663-7.8002, $p=0.0135$). Apenas três (5,4%) nos nódulos TIRADS 3 apresentaram Bethesda maior ou igual a IV. Dos nódulos 4A, 29 (76,3%) foram benignos contudo 53,3% dos 4B não apresentaram citologia Bethesda II. O subgrupo 4C expressaram 83,3% de indícios para malignidade. Quando analisado correlação TIRADS 4 e Bethesda \geq IV e VI, detectou-se relação positiva (OR=4.9362, IC=1.3155-18.5218, $p=0.0180$; OR=6.0204, IC=1.2591-28.7867, $p=0.0245$ respectivamente) (Tabelas 11,12 e 13).

Tabela 11. Distribuição do número de nódulos de acordo com Classificação TIRADS.

2	TIRADS			5
	3	4		
05	56	A	B	0
		38	15	06

Tabela 12. Percentual de distribuição dos nódulos benignos de acordo com a Classificação TIRADS.

2	TIRADS - BENIGNO			
	3	4A	4B	4C
100%	85,7%	76,3%	46,7%	16,6%
05	48	29	07	01

Tabela 13. Percentual de distribuição dos nódulos malignos de acordo com a Classificação TIRADS.

2	TIRADS - MALIGNO			
	3	4A	4B	4C
0%	3,6%	5,3%	20%	83,3%
0	02	02	03	05

5.4 Resultados Imunocitoquímicos (ICQ)

Foram selecionados os nódulos Bethesda II (com diagnóstico de tireoidite linfocítica crônica), III, IV, V e VI para pertencerem ao grupo caso e serem submetidos a ICQ para MMP-2, MMP-9 e TIMP-2, porém 11 amostra esgotaram durante a fase teste e duas apresentaram-se sem celularidade na fase de análise, restando 26 nódulos, sendo composto por seis tireoidite crônica linfocítica, nove atipia/lesão folicular de significado indeterminado e 11 carcinomas.

Para o grupo controle foram elegidos 21 nódulos com resultado citológico de bócio nodular e nódulo folicular benigno.

A reatividade aos anticorpos foi avaliada em:

1- Negativas, quando menos de quatro células epiteliais foliculares do parênquima marcaram.

2- Positiva, quando a marcação ocorreu em mais de quatro.

Entre o grupo positivo foi realizada uma análise semi-quantitativa, utilizando-se o critério de intensidade da reação no núcleo e/ou citoplasma destas células comparado ao controle negativo:

1-Reatividade leve (+), quatro a nove núcleos e/ou citoplasmas reativos;

2-Reatividade moderada (++), 10 a 15 núcleos e/ou citoplasmas reativos, e intensidade superior a reação leve (+).

3-Reatividade acentuada (+++), acima de 15 núcleos e/ou citoplasmas reativos e intensidade superior a reação moderada (++).

Só foram consideradas células foliculares para análise de reatividade, seja com padrão difuso ou granular. Entretanto, houve reatividade destes anticorpos em células estromais (mio/fibroblastos e endoteliais) e inflamatórias, porém não incluídos nos objetivos da análise.

Para o controle de reatividade foi utilizado o mesmo protocolo de reatividade na ausência do anticorpo primário.

De uma maneira geral, analisando os grupos (controle e casos) foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 14):

1-Grupo controle Bethesda II (bócio nodular e nódulo folicular benigno): nenhum apresentou reação para TIMP-2, 11 (52%) reagiram para MMP-9 e 20 (95,2%) para MMP-2 (Figura 9);

2-Grupo de casos Bethesda II (tireoidite crônica): não houve reatividade para TIMP-2 e MMP-9, e quatro (66,6%) tiveram reatividade para MMP-2 (Figura 10);

3-Grupo de casos Bethesda III: dois (22,22%) expressaram TIMP-2, dois (22,22%) MMP-9 e oito (88,88%) MMP-2 (a única amostra não reagente se deveu a fato de não apresentar celularidade) (Figura 11).

4-Grupo de casos Bethesda VI: nove (81,81%) reagiram positivamente para TIMP-2, 11 (100%) para MMP-9 e 11 (100%) para MMP-2 (Figura 12).

Tabela 14. Resultado imunocitoquímico da expressão dos anticorpos de acordo com a classificação Bethesda.

CLASSIFICAÇÃO	MMP-2	MMP-9	TIMP-2
Bethesda I (bócio - n=21)	20	11	0
Bethesda II (tireoidite - n=06)	04	0	0
Bethesda III (n=09)	08	02	02
Bethesda VI (n=11)	11	11	09

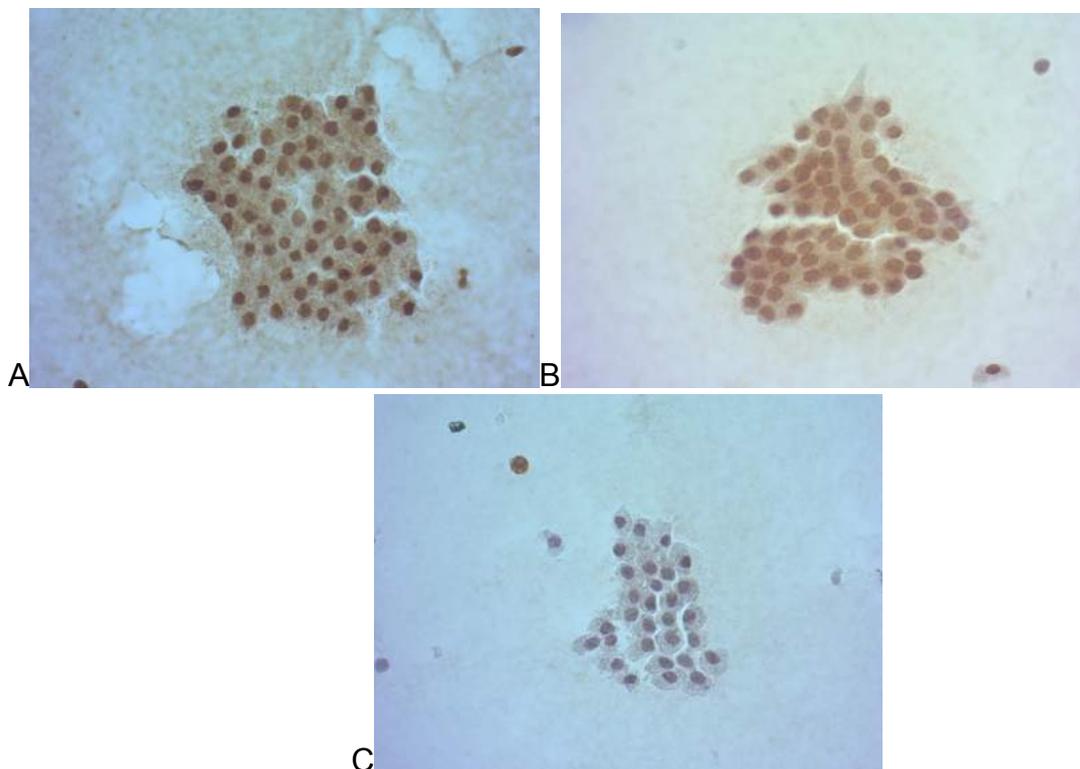


Figura 9. Imunocitoquímica - Expressão dos anticorpos MMP-2 (A) e MMP-9 (B) em nódulo Bethesda II com diagnóstico de bócio nodular, e ausência de expressão do anticorpo TIMP-2 (C) neste mesmo nódulo (P071).

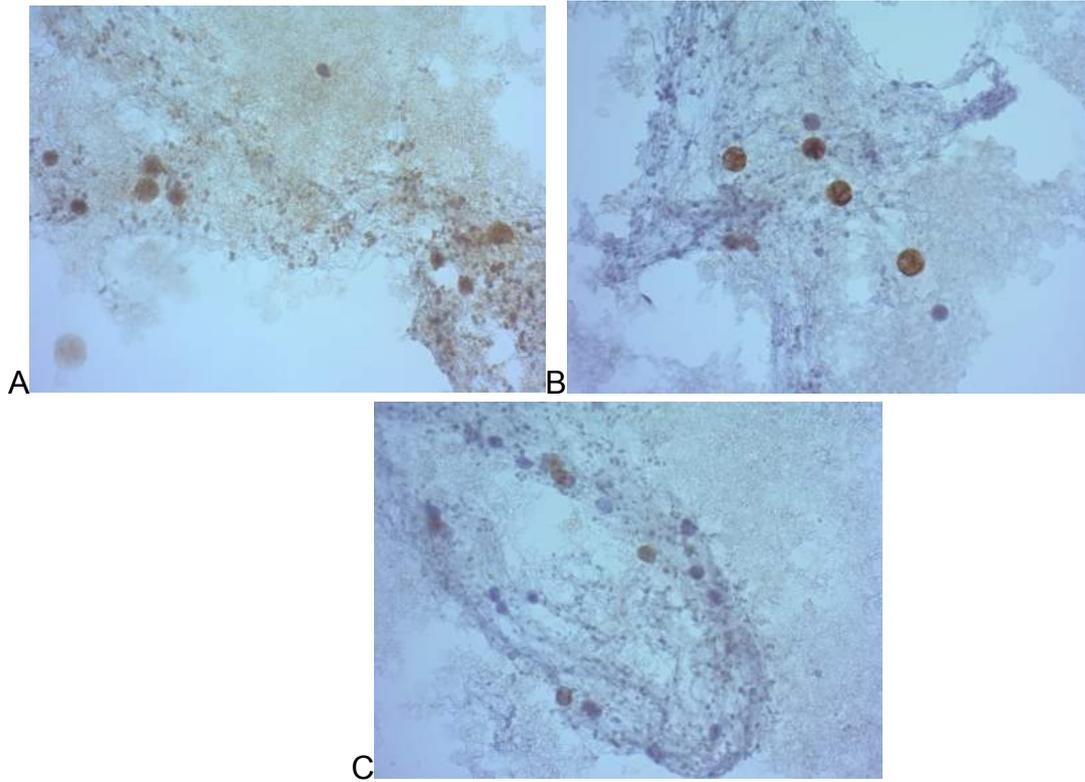


Figura 10. Imunocitoquímica - Expressão do anticorpo MMP-2 (A) em nódulo Bethesda II com diagnóstico de tireoidite crônica, e ausência de expressão dos anticorpos MMP-9 (B) e TIMP-2 (C) neste mesmo nódulo (P158).

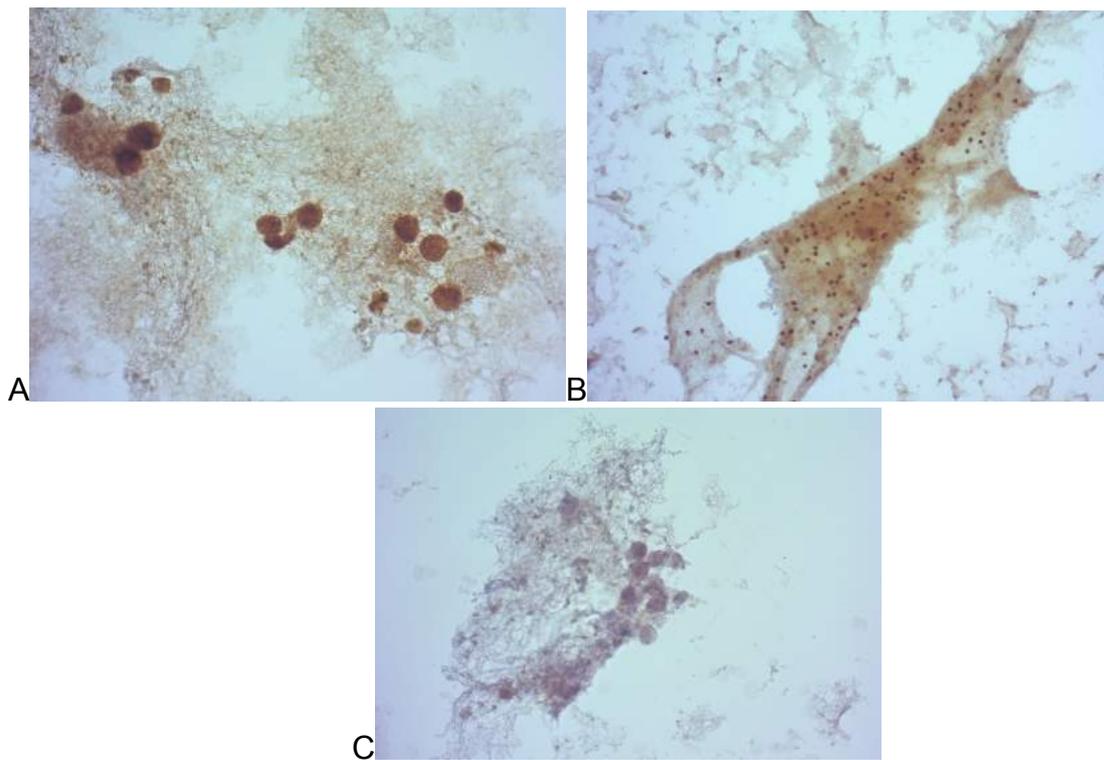


Figura 11. Imunocitoquímica - Expressão do anticorpo MMP-2 (A) em nódulo Bethesda III, com diagnóstico de atipia de significado indeterminado, e ausência de expressão dos anticorpos MMP-9 (B) e TIMP-2 (C) neste mesmo nódulo (P072).

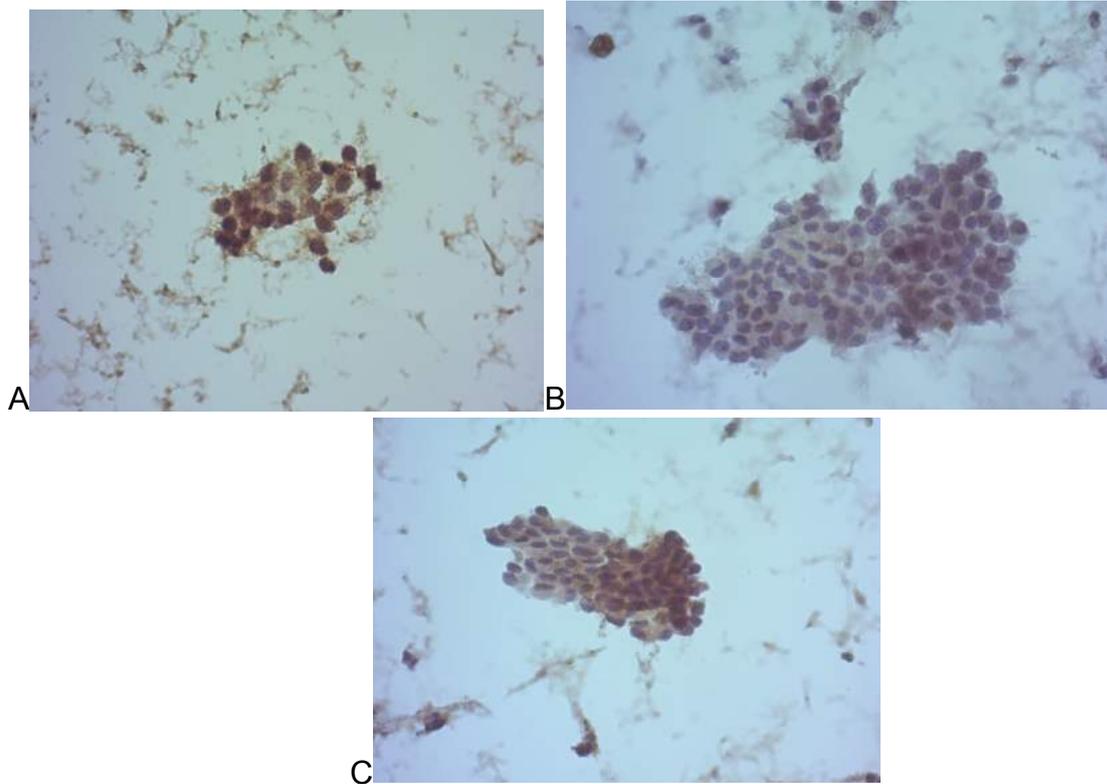


Figura 12. Imunocitoquímica - Expressão dos anticorpos MMP-2 (A), MMP-9 (B) e TIMP-2(C) em nódulo Bethesda VI, com diagnóstico de carcinoma papilífero (P123).

O grau de quantificação de cada anticorpo e o grupo estudado encontra-se listado nas tabelas (Tabelas 15,16,17,18) abaixo:

Tabela 15. Expressão dos anticorpos no grupo com bócio nodular e nódulo folicular benigno.

BETHESDA II – BN e NFB (N=21)	-	+	++	+++
MMP-2	1	0	04	16
MMP-9	10	03	08	0
TIMP-2	21	0	0	0

BN = Bócio Nodular, NFB= Nódulo Folicular Benigno, -= negativo, += leve, ++= moderado, +++= acentuada

Tabela 16. Expressão dos anticorpos no grupo caso com tireoidite crônica linfocítica.

BETHESDA II -TCL (N=06)	-	+	++	+++
MMP-2	02	02	01	01
MMP-9	06	0	0	0
TIMP-2	06	0	0	0

TCL=Tireoidite Crônica Linfocítica, -= negativo, += leve, ++= moderado, +++= acentuada

Tabela 17. Expressão dos anticorpos no grupo caso com atipia de significado indeterminado

BETHESDA III (N=09)	-	+	++	+++
MMP-2	0	01	02	06
MMP-9	07	0	02	0
TIMP-2	07	01	01	0

* Um nódulo apresentou sem celularidade em MMP-2.- =negativo, += leve, ++= moderado, +++= acentuada

Tabela 18. Expressão dos anticorpos no grupo caso com malignidade.

BETHESDA V (N=11)	-	+	++	+++
MMP-2	0	0	04	07
MMP-9	0	0	10	01
TIMP-2	02	04	05	0

- =negativo, += leve, += moderado, +++= acentuada

Os anticorpos para MMP-2 apresentaram reatividade em todos os grupos da análise, sem diferenças estatísticas entre eles, exceto quando se comparou os nódulos benignos com bócio nodular e nódulo folicular benigno com as tireoidites crônicas linfocíticas, notando-se que os primeiros possuíam maior intensidade de reação, +++ (Estimate 3.4012, Error=1.6021, $z=2.123$, $p=0.0338$). Os anticorpos para MMP-9 tiveram reatividade predominante na classificação Bethesda VI, porém também não foi atingido valores significativos na análise em regressão logística. Quando utilizado o teste de razão de possibilidade, confrontado benignos e malignos, observou-se maior expressão nos nódulos cancerígenos (OR=33.0000, IC=17623-617.9305, $p=0.0193$); bem como quando contraposto Bethesdas II e III com VI (OR=40.0370, IC=2.1821-734.5967, $p=0.0129$).

As maiores diferenças em regressão logística ocorreram na análise dos anticorpos para TIMP-2, com valores significativos quando se comparou a expressão desta proteína entre lesões de natureza malignas e as demais (benignas e indeterminadas) ($p=0.000126$), assim como quando se considerou isoladamente a intensidade da reação: + ($p=0.002460$) e ++ ($p=0.000541$), não se tendo relevância estatística na reação intensa (+++). Evidencia-se ainda a mesma relação contrastando Bethesda VI com III ($p=0.00919$), e se relevado a força de expressão, apenas com valores significativos para o padrão ++ ($p=0.0202$). Em análise de razão de possibilidade, defrontando benignidade (II) com malignidade (VI) e confrontando Bethesda II e III com VI, verificou-se resultados significantes em ambas as análises (OR=348.3333, IC=13.0475-9299.5450, $p=0.0005$ e OR=153.0000, IC=12.4288-1883.4542, $p=0.0001$ respectivamente).

6 DISCUSSÃO

Os nódulos tireoideanos são extremamente frequentes ultrassonograficamente, sendo encontrado em aproximadamente 60% destes exames, entretanto, a malignidade está presente em apenas 1,6% a 12% (GRANT et al., 2015). O câncer de tireoide, apesar de na grande maioria das vezes apresentar-se com bom prognóstico, pode evoluir de forma mais agressiva, com alta letalidade (COELI et al., 2005).

O tipo de carcinoma tireoideano mais encontrado na pesquisa foi o papilífero, sendo um percentual um pouco superior ao da literatura (50-80%) (INCA, 2014, 2016). O adenocarcinoma medular e o anaplásico representam menos de 10% das neoplasias da tireoide (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008); neste estudo nenhum caso do primeiro, e apenas um do segundo (8,33%), foi encontrado. O padrão folicular é o segundo mais frequente (10-20%) (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014), entretanto, foi achado apenas um nódulo Bethesda IV (neoplasia folicular), que necessita de estudo histológico para confirmação de malignidade. Estudo de metanálise com 2.725 casos, identificaram apenas 2% do subtipo medular e 1% do anaplásico, e não observou diferença de distribuição histológica entre as áreas geográficas (PRESTON-MARTIN et al., 2003), o que fundamenta nossa ausência do padrão medular e único caso do anaplásico.

6.1 Dados Epidemiológicos

Na análise dos dados deste estudo, observou-se que a maioria dos participantes são do gênero feminino, assim como dos que possuem nódulos malignos, concordante com a frequência duas e três vezes maior de neoplasia tireoideana em mulheres (INCA, 2016; PRESTON-MARTIN et al., 2003). Tais resultados podem ser explicados por fatores hormonais (INCA, 2016) devido a ação do estrogênio sobre o hormônio estimulante da tireoide (TSH) (ROSSING et al., 2000). Contudo, proporcionalmente ao sexo, a malignidade foi mais frequente entre os homens; motivo pelo qual o gênero masculino é considerado fator de risco para câncer desta glândula (ROSÁRIO et al., 2013), porém nossos valores não foram significantes provavelmente devido ao pequeno número de homens no estudo.

Outro fator que eleva a chance de um nódulo tireoideano ser maligno é quando este se apresenta em indivíduo de idade inferior aos quinze anos ou

superior aos quarenta e cinco (NACHIAPPAN et al., 2014). Não foi encontrado nenhum paciente adolescente ou criança com malignidade no estudo, porém apenas uma paciente entre os noventa do estudo encontrava-se nesta faixa etária, devido o atendimento infantil não ser abrangente no hospital onde foi realizado a pesquisa. A correlação com indivíduos acima de 45 anos foi positiva, contudo, não estatisticamente significativa, provavelmente secundário ao restrito número de amostras malignas.

A raça negra apresenta menor risco de carcinoma papilífero de tireoide em relação a etnia branca (ASCHEBROOK-KILFOY et al., 2013); em um estudo nos Estados Unidos, sugeriu-se que o câncer de tireoide será a segunda neoplasia mais comum, perdendo apenas para mama, em mulheres hispânicas em futuro próximo (ASCHEBROOK-KILFOY et al., 2013). Não houve diferença estatística na análise da raça nesta pesquisa, achado que pode estar relacionado a grande miscigenação étnica brasileira, além de poucos representantes negros, asiáticos (amarelo) e indígenas.

Alguns trabalhos estudaram a diferença de prevalência de câncer de tireoide entre regiões (COELI et al., 2005). Na presente análise, tentou-se averiguar se havia diferença de distribuição entre a população da região metropolitana e do interior do estado, não se observando correlação. Poderia se esperar um maior número de casos entre os da capital, visto que haveria maior disponibilidade de recursos médicos e diagnósticos que nas regiões interioranas, assim como sugerido por Coeli et al. (2005) (COELI et al., 2005). Entretanto, deve-se lembrar que todos os pacientes do estudo foram atendidos em um mesmo serviço, voltado a assistência a população carente do Sistema Único de Saúde, o que pode justificar estes achados.

Apesar não ter sido avaliado diretamente a renda familiar dos participantes, a pesquisa do grau de instrução analisa indiretamente esse perfil. Considerando desigualdade na incidência de nódulos e câncer de tireoide em populações com diferentes níveis socioeconômicos, espera-se maior detecção naqueles com melhor nível, devendo-se ao maior acesso a exames diagnósticos (INCA, 2016). Baixa escolaridade da maioria dos participantes reflete mais uma vez, a situação socioeconômica da população carente atendida no hospital em pesquisa.

O tabagismo e o etilismo são dois hábitos bastante relacionados a carcinogênese, todavia, em estudos avaliando câncer de tireoide, esses vícios ainda apresentam dados inconsistentes (COELI et al., 2005), com relatos em alguns

estudos de atuarem com ação protetora (KITAHARA et al., 2011a; PRESTON-MARTIN et al., 2003; ROSSING et al., 2000), por reduzir a proliferação de células tireoideanas através de efeitos sobre o TSH, o estrógeno e outros mecanismos (ROSSING et al., 2000). Neste estudo não foi possível associação em virtude de poucos participantes relatando estes vícios.

A obesidade é fator de risco para malignidade em diversos órgãos do corpo humano, sendo observado também associação com câncer de tireoide (KITAHARA et al., 2011b), apesar de dados heterogêneos entre os estudos (PRESTON-MARTIN et al., 2003). Não obstante, neste estudo, o maior índice de sobrepeso e/ou obesidade com relevância estatística não foi observada.

Existe associação definida de alterações genéticas e herança familiar de câncer de tireoide, principalmente relacionado ao subtipo medular (HEGEDÜS, 2004; INCA, 2016). O resultado encontrado da maioria dos pacientes com histórico familiar não possuir malignidade, assim como a minoria dos pacientes com citologia maligna apresentar história familiar positiva, pode estar relacionado ao não achado de nenhum carcinoma medular neste estudo.

Existe vínculo estabelecido entre desordens tireoideanas benignas, como bócio, nódulo benigno e adenoma, com carcinoma tireoideano (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008; COELI et al., 2005; PRESTON-MARTIN et al., 2003), principalmente de linfoma em pacientes com Doença de Hashimoto (HEGEDÜS, 2004), não sendo, entretanto, encontrado relevância na pesquisa, quando avaliado pacientes submetidos a tireoidectomia parcial desta glândula ou em uso de medicação específica, justificando-se ao pequeno número de enfermos com relato destes tratamentos e nenhum caso de linfoma no estudo. A relação negativa com prescrição medicamentosa encontrada, é apoiada pela constatação de a maioria dos pacientes com câncer ser eutiroideanos (HEGEDÜS, 2004), assim como o hipotireoidismo não apresenta associação de elevação de risco (PRESTON-MARTIN et al., 2003). Essa forte associação de doença nodular benigna ou bócio pode ser outra justificativa a explicar a maior incidência de câncer no gênero feminino, visto que essas alterações são mais prevalentes nas mulheres (PRESTON-MARTIN et al., 2003).

A exposição a radiação ionizante é o principal fator de risco estabelecido para câncer de tireoide (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008; INCA, 2016). Neste estudo, foi avaliado essa exposição através do histórico de iodo radioativo,

confirmado por apenas três pacientes. Devido ao pequeno número de estudados submetidos a esse tipo de terapia, não se observou relação.

Apesar de outros artigos relatarem as associações acima referidas (INCA, 2014; NACHIAPPAN et al., 2014; ROSÁRIO et al., 2013), e este estudo apresentar percentual de incidência de malignidade concordante com a literatura (GRANT et al., 2015), o número restrito de amostras malignas pode ter contribuído para esses achados não estatísticos. Possivelmente uma avaliação incluindo um maior número de casos possa demonstrar uma provável associação destas variáveis com o aumento do risco neoplásico.

6.2 Dados Ultrassonográficos

Na análise das dimensões dos nódulos, não foi possível correlação estatística significativa entre dimensões do nódulo e risco de câncer de tireoide. Em acordo, Grant et al. (2015) (GRANT et al., 2015) sugere que o tamanho destas lesões não pode ser utilizado como preditor independente de risco de malignidade, justificando esse parâmetro não estar incluído na classificação TIRADS.

Algumas características de avaliação ultrassonográfica já estão bem estabelecidas como preditoras de risco de malignidade, entre elas, composição sólida, hipocogenicidade, margens não circunscritas, forma verticalizada e presença de microcalcificação (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014; PARK et al., 2009). Este presente trabalho ratificou essas relações; esta comprovação de associação desses cinco achados ultrassonográficos, corroboram a classificação TIRADS adotada por Kwak et al. (2011).

A classificação TIRADS, assim como a avaliação individual das características dos nódulos, também apresentou-se concordante com a agressividade quando correlacionado a classificação Bethesda. Assim como no BIRADS, os nódulos rotulados como TIRADS 2 e 3 não tem indicação de procedimento intervencionista no momento do diagnóstico (COUTINHO; INGLEZ, 2016). As lesões tireoideanas identificadas como TIRADS 4 no estudo, também se correlacionam significativamente com risco de malignidade. Tais nódulos, portanto, devem ser puncionados para avaliação citológica ao diagnóstico ultrassonográfico, como proposto por Kwak et al. (2011).

Apesar de maior a chance de benignidade observada nas lesões de composição cística, anecóicas, hiperecóicas, com colóide espesso, e com halo

hipoecóico, assim como sugerido na literatura (NACHIAPPAN et al., 2014), não foram obtidos valores significativos no presente estudo, não se pode afirmar que a presença destas características isoladas excluem malignidade. De acordo com estes resultados, vê-se a necessidade de prosseguir com mais estudos sobre o tema, e considerar a possibilidade de investigações por ICQ com o material citológico oriundo da PAAF como uma ferramenta complementar diagnóstica.

6.3 Dados Imunocitoquímicos

As MMPs são enzimas observadas em vários processos neoplásicos, incluindo coloretal, mama, bexiga e tireoide (KRIZKOVA et al., 2011). Apresentam diversas ações relacionadas a carcinogênese como degradação da MEC, membrana basal e destruição da adesão celular, estando relacionado ao processo de desenvolvimento, crescimento, invasão e disseminação tumoral (CURRAN; MURRAY, 2000).

Neste estudo foi avaliado a expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 em pacientes portadores de nódulos tireoideanos através da técnica de imunocitoquímica.

A superexpressão das proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 nas células tumorais dos nódulos malignos de tireoide neste trabalho apresentou resultados mais expressivos que os por imunohistoquímica (IHQ) de Maeta et al. (2001) (MAETA; OHGI; TERADA, 2001), com percentual de 100%, 100% e 81,81% respectivamente, sendo semelhantes para MMP-2 e MMP-9 e maior para TIMP-2 que os encontrado por Tomita et al. (1997) com ICQ (TOMITA; IWATA, 1997).

A técnica de ICQ já foi demonstrada ser útil no diagnóstico de tumores tireoideanos primários, assim como de suas metástases linfonodais, tanto para diagnóstico, como para confirmar os achados citológicos convencionais (MARCHETTI et al., 1996). Aratake et al. (2010) comparou os dois métodos de ICQ e IHQ na detecção de indutor de metaloproteinase de matriz extracelular em carcinoma papilífero de tireoide, apresentando respostas semelhantes, validando os resultados por citologia (ARATAKE et al., 2010). A vantagem de utilização da estratégia da ICQ em relação a da IHQ é que permite a avaliação dos nódulos tireoideanos antes do procedimento cirúrgico, no momento do diagnóstico citológico através da punção aspirativa com agulha fina, inclusive podendo-se reutilizar as

lâminas que foram coradas por Papanicolaou para o diagnóstico, ou seja, a mesma lâmina pode ser descorada e submetida a ICQ.

A imunoreatividade para MMP-2 apesar de presente em todos os casos de carcinoma, também apresentou-se expressivamente em nódulos com diagnóstico de bócio nodular, lesão folicular benigna, tireoidite crônica linfocítica e atipia folicular de significado indeterminado. Korem et al. (2002) encontrou em seu estudo fraca a moderada reação de MMP-2 em células foliculares normais de bócio multinodular e adenoma folicular, porém com expressão de forte intensidade apenas nos casos de carcinoma papilífero (KOREM et al., 2002). Tais achados também já foram observados por Campo et al. (1992) e a elevação em condições benignas deve-se a ação desta enzima em processos de remodelação e reparo (CAMPO et al., 1992). A análise da sua reatividade serve como parâmetro de positividade para as lesões supracitadas, porém, sem especificidade.

A MMP-9 esteve aumentada em nódulos malignos em relação aos benignos nas análises ICQ. Meng et al. (2012) encontrou resultados similares em IHQ, e associou esta elevação ao aumento do tamanho tumoral, à presença de metástase linfonodal e estágio maior de comprometimento clínico, tendo papel fundamental na invasão e doença metastática no PTC (MENG et al., 2012). Dados similares aos de Marecko et. al (2014), em que a forma ativa de MMP-9, nos PTC, esteve associada com invasão extratireoideana, metástase linfonodal e grau de infiltração tumoral, podendo ser utilizado como ferramenta para prever o comportamento tumoral (MARECKO et al., 2014).

A superexpressão de MMP ou regulação negativa de TIMP, tornam as células cancerígenas mais agressivas, assim como a regulação negativa de MMP ou superexpressão de TIMP as deixam menos agressiva (STERNLICHT, 2001). Neste trabalho foi observado tanto o aumento das MMP-2 e MMP-9 como do TIMP-2 nos nódulos malignos, contrariando essa teoria. Essa ausência de balanço entre MMP e TIMP, pode estar justificado devido outras funções dos TIMPs além do efeito inibitório sobre as MMPs. A MMP-9 é ativada por proteases séricas presentes no meio extracelular, enquanto que a MMP-2 depende de ação de MMP-TM, que coatuam junto ao TIMP-2 (STERNLICHT, 2001). Esse aumento paradoxal do TIMP foi já correlacionado a pobre prognóstico de tumores malignos, sendo explicado pela sua atividade promotora de crescimento sobre algumas células (KRAIEM; KOREM, 2000). Maeta et al. (2001) também encontrou elevação de TIMP-1 e TIMP-2 em

células tumorais de tireoide em relação ao tecido não tumoral desta glândula, e essa expressão esteve associada a um maior volume da neoplasia e a maior invasibilidade (MAETA; OHGI; TERADA, 2001).

Como foi evidenciado resultados significativos para diferenciação entre benignidade e malignidade através da expressão de MMP-9 e TIMP-2 para os carcinomas papilíferos do estudo, novas pesquisas utilizando ICQ durante ou após as punções aspirativas poderia ajudar na distinção entre adenoma e carcinoma folicular, visto que essa diferenciação só é obtida por análise histológica pós-cirúrgica (COQUIA; CHU; HAMPER, 2014). Outros estudos futuros poderiam também trazer informações adicionais no acompanhamento de nódulos Bethesda I e III, que necessitam repunção em intervalo de 3 a 6 meses (ROSÁRIO et al., 2013), com finalidade de avaliar se a ICQ na punção inicial determinaria melhor a natureza desta lesão, não retardando o diagnóstico nos casos de malignidade, visto que o risco destas lesões serem câncer é de 5 a 15% (CIBAS; ALI, 2009).

7 CONCLUSÕES

Na avaliação epidemiológica, houve tendência a malignidade em pacientes do sexo masculino, com idade superior a 45 anos e submetidos ao iodo radioativo, porém não se podendo afirmar correlação estatística. Estudo com uma população maior poderá trazer informações adicionais e ratificar alguns dos achados deste estudo, permitindo assim definir o grupo de pessoas que poderiam se beneficiar de rastreios ultrassonográficos anuais, visto que apresentam maior risco de desenvolvimento de câncer de tireoide.

Considerando a associação entre os achados ultrassonográfico dos nódulos tireoideanos e seus resultados citológicos, assim como a correlação com a classificação TIRADS, evidenciou-se que nódulos sólido, hipoecóico, não circunscrito, não paralelo e com microcalcificação, bem como aqueles classificados em TIRADS 4 devem ser submetidos a punção diagnóstica por agulha fina, devido a maior chance de estarem relacionados com malignidade. Já aqueles nódulos classificados com TIRADS 2 e 3 não teria indicação ao procedimento intervencionista, reduzindo-se assim biópsias desnecessárias, com isso, evitando complicações inerentes a intervenção, além de minimizar custos financeiros com saúde. Apesar de não ser uma classificação utilizada na prática clínica, o presente estudo confirmou que sua aplicabilidade traz benefícios para seleção do nódulo a ser biopsiado.

As proteínas MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 estão presente e aumentadas em células tumorais tireoideanas, principalmente considerando o subtipo papilífero, que foi o mais frequente na pesquisa. Pode-se utilizar a expressão das MMP-9 e TIMP-2, em coleta de punção aspirativa, para diferenciar entre os nódulos benignos e malignos. Esses resultados permitem a continuidade de pesquisas utilizando essas enzimas como potencial alvo diagnóstico, principalmente em nódulos que apresentam citologia não esclarecedora, além de possível alvo terapêutico em doenças malignas desta glândula.

REFERÊNCIAS

- ADAMI, H.-O.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. Thyroid Cancer. In: **Textbook of Cancer Epidemiology**. [s.l: s.n.].
- ARATAKE, Y. et al. EMMPRIN (CD147) expression and differentiation of papillary thyroid carcinoma: Implications for immunocytochemistry in FNA cytology. **Cytopathology**, v. 21, n. 2, p. 103–110, 2010.
- ASCHEBROOK-KILFOY, B. et al. The acceleration in papillary thyroid cancer incidence rates is similar among racial and ethnic groups in the United States. **Annals of surgical oncology**, v. 20, n. 8, p. 2746–53, 2013.
- BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors : biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 19, p. 3719–3727, 2002.
- BRUCE, A. ET AL. **Biologia molecular da Célula**. 5a. edição ed. [s.l: s.n.]. v. XXXIII
- CAMPO, E. et al. Distribution of the 72-kd type IV collagenase in nonneoplastic and neoplastic thyroid tissue. **Human Pathology**, v. 23, n. 12, p. 1395–1401, 1992.
- CHENG, S.-P. et al. Characterization of thyroid nodules using the proposed thyroid imaging reporting and data system (TI-RADS). **Head & Neck**, v. 35, n. 4, p. 541–547, 2013.
- CHO MAR, K. et al. Expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant follicular thyroid lesions. **Histopathology**, v. 48, p. 286–294, 2006.
- CIBAS, E. S.; ALI, S. Z. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. **Am J Clin Pathol**, v. 132, p. 658–665, 2009.
- COELI, C. M. et al. Incidência e mortalidade por câncer de tireóide no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 4, p. 503–509, 2005.
- COQUIA, S. F.; CHU, L. C.; HAMPER, U. M. The Role of Sonography in Thyroid Cancer. **Radiologic Clinics of North America**, v. 52, n. 6, p. 1283–1294, 2014.
- COUTINHO, W. L.; INGLEZ, K. G. (EDS.). **Atlas BI-RADS do ACR: sistema de laudo e registro de dados de imagem da mama**. 2a. edição ed. São Paulo: [s.n.].
- CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases : molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1621–1630, 2000.
- EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer

progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161–74, mar. 2002.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. Setima ed. [s.l.] Editora Guanabara Koogan, 2006.

GRANT, E. G. et al. Thyroid ultrasound reporting lexicon: White paper of the ACR thyroid imaging, reporting and data system (TIRADS) committee. **Journal of the American College of Radiology**, v. 12, p. 1272–1279, 2015.

HEGEDÜS, L. The Thyroid Nodule. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1764–1771, 2004.

HOJILLA, C. V; MOHAMMED, F. F.; KHOKHA, R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. **British journal of cancer**, v. 89, n. 10, p. 1817–1821, 2003.

HORVATH, E. et al. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 5, p. 1748–1751, 2009.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2014.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**, 2016.

KHOKHA, R.; MURTHY, A.; WEISS, A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. **Nature Publishing Group**, v. 13, n. 9, p. 649–665, 2013.

KITAHARA, C. M. et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. March, p. 464–472, 2011a.

KITAHARA, C. M. et al. Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 20, n. March, p. 464–472, 2011b.

KOREM, S. et al. Increased expression of Matrix Metalloproteinase-2: A Diagnostic Marker bu Not Prognóctic Marker of Papillary Thyroid Carcinoma. **IMAJ**, v. 4, p. 247–251, 2002.

KRAIEM, Z.; KOREM, S. Matrix metalloproteinases and the thyroid. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 10, n. 12, p. 1061–1069, 2000.

KRIZKOVA, S. et al. Assays for determination of matrix metalloproteinases and their

- activity. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1819–1832, 2011.
- KWAK, J. Y. et al. Thyroid Imaging Reporting and Data System for US Features of Nodules: A Step in Establishing Better Stratification of Cancer Risk. **Radiology**, v. 260, n. 3, p. 892–899, 2011.
- LENZ, G. Métodos Imunológicos. In: **Métodos imunológicos**. Porto Alegre: UFRGS-Biofísica: [s.n.]. p. 1–14.
- MAETA, H.; OHGI, S.; TERADA, T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. **Virchows Archiv**, v. 438, p. 121–128, 2001.
- MARCHETTI, I. et al. The role of immunocytochemistry (icc) in cytological diagnosis of primary and metastatic thyroid tumora. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 50, n. 8, p. 409, 1996.
- MARECKO, I. et al. Enhanced activation of matrix metalloproteinase-9 correlates with the degree of papillary thyroid carcinoma infiltration. **Croatian Medical Journal**, v. 55, n. 2, p. 128–137, 2014.
- MENG, X. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) papillary thyroid carcinomas. v. 6, n. 44, p. 3075–3079, 2012.
- NACHIAPPAN, A. C. et al. The thyroid: review of imaging features and biopsy techniques with radiologic-pathologic correlation. **Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc**, v. 34, p. 276–93, 2014.
- OVERALL, C. M.; KLEIFELD, O. Validating matrix metalloproteinases as drug target and anti-targets for cancer therapy. **Nature**, v. 6, p. 227–239, 2006.
- PARK, J.-Y. et al. A proposal for a thyroid imaging reporting and data system for ultrasound features of thyroid carcinoma. **Thyroid**, v. 19, n. 11, p. 1257–1264, 2009.
- PRESTON-MARTIN, S. et al. Thyroid cancer pooled analysis from 14 case-control studies: what have we learned? **Cancer Causes and Control**, v. 14, n. 8, p. 787–789, 2003.
- ROSÁRIO, P. W. et al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 4, n. 57, p. 240–264, 2013.
- ROSSING, M. A. et al. Risk of Papillary Thyroid Cancer in Women in Relation to SMoking and Alcohol Consumption. **Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 49–54, 2000.
- RYDLOVA, M. et al. Biological activity and clinical implications of the matrix

metalloproteinases. **Anticancer research**, v. 28, n. 2B, p. 1389–1397, 2008.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

STERNLICHT. **Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy**. New York: [s.n.].

TOMITA, T.; IWATA, K. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thyroid C-cells and medullary thyroid carcinomas.

Histopathology, v. 31, p. 150–156, 1997.

VIDAL, R. et al. Metaloproteinases : aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82–88, 2011.

WHITE, B. A.; PORTERFIELD, S. P. The thyroid gland. **Endocrine and Reproductive Physiology**, p. 129–146, 2013.

YADAV, L. et al. Matrix metalloproteinases and cancer - Roles in threat and therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 1085–1091, 2014.

Apêndice A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências Biológicas
 Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares - LPCM
 Coordenador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto



Questionário da Coleta

Registro Interno No. _____

Nº Prontuário: _____

Nº Pedido: _____

Data da coleta: ____/____/20____

Identificação e dados clínicos

Nome: _____ Idade: _____

Data nascimento: ____/____/____ Município de origem: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Etnia: () Branco () Preto () Pardo () Amarelo () Indígena

Escolaridade : () Ensino fundamental incompleto () Ensino fundamental completo

() Ensino médio incompleto () Ensino médio completo

() Ensino superior incompleto () Ensino superior completo

Sexo: () Masculino () Feminino

Tabagismo: () Sim () Não Quanto: _____

Etilismo : () Sim () Não Quanto: _____

Peso: _____ Kg Altura: _____ m

Trabalha () Não – () aposentado () desempregado

() Sim – Qual: _____

Histórico

• Histórico familiar de CA de tireoide: () Não () Sim- Tipo _____

____ Grau de parentesco: _____

• Tratamento prévio cirúrgico da tireoide: () Não () Sim – Há quanto tempo? _____

• Tratamento com iodo radioativo: () Não () Sim – Há quanto tempo? _____

• Tratamento com medicamentos para tireoide: () Não () Sim - Qual ? _____

- Outras medicações não relacionadas a tireoide: _____
- Tratamento prévio radioterápico cervical: () Não () Sim

Exames Laboratoriais:

T3: _____

T4: _____

TSH: _____

Anticorpos: _____

Exames de USG - Quantidade de nódulos: _____

NÓDULO 1: Composição: () Sólido () Cístico () Misto

Se misto: () Cístico-Sólido () Misto Pred Sólido () Misto Pred Cístico

Ecogenicidade: () Hipoecóico () Hiperecóico () Isoecóico () Anecóico

Localização: () LD () LE () Istmo () PS () PI () TM

Forma: () Mais alto do que largo () Mais largo do que alto

Margens: () Circunscritas () Irregulares

Calcificação: () Ausente () Presente – Se presente: () Micro () Macro

Tamanho: _____ x _____ x _____ cm

Outras características: _____

NÓDULO 2: Composição: () Sólido () Cístico () Misto

Se misto: () Cístico-Sólido () Misto Pred Sólido () Misto Pred Cístico

Ecogenicidade: () Hipoecóico () Hiperecóico () Isoecóico () Anecóico

Localização: () LD () LE () Istmo () PS () PI () TM

Forma: () Mais alto do que largo () Mais largo do que alto

Margens: () Circunscritas () Irregulares

Calcificação: () Ausente () Presente – Se presente: () Micro () Macro

Tamanho: _____ x _____ x _____ cm

Outras características: _____

Resultados:

NÓDULO 1 Citologia: _____

Imunocitoquímica: _____

NÓDULO 2 Citologia: _____

Imunocitoquímica: _____

Responsável pela punção: _____ Sala: _____

Responsável pelo preenchimento: _____

Anexo A



Universidade Federal de Pernambuco

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Expressão das metaloproteinases em pacientes portadores de nódulos tireoidianos e sua associação com aspectos ultrassonográficos**” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Ana Karina Brizeno Ferreira Lopes (residente na Rua Luis de Farias Barbosa, 287 – Boa Viagem – Recife/PE, CEP: 51020110, telefone: 081991663853 , e-mail: akbfl@terra.com.br). Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Ingrid Tavares de Lima (Telefone: 081987230257) e Josélio Soares (Telefone: 083 999508985) e está sob a orientação do professor Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (e-mail: jacintocosta@hotmail.com).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

O objetivo dessa pesquisa é estudar fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de tireoide, para isso vamos utilizar os resultados dos seus exames bem como parte das amostras coletadas para realizar os estudos laboratoriais. Sua participação nesta pesquisa consistirá em autorizar o uso das amostras coletadas durante seus exames de rotina e responder a um questionário sobre seu histórico de saúde e estilo de vida. Como as amostras utilizadas no projeto serão resgatadas após a realização dos seus exames, não há nenhum tipo de risco. Caso se sinta constrangida com alguma pergunta do questionário pode ficar a vontade para não responder, ressaltamos que este será aplicado de forma discreta e individual e as respostas são sigilosas. A sua colaboração é voluntária, ou seja, não é obrigatória. Os benefícios em cooperar com a pesquisa consistem em: exames complementares para o diagnóstico do vírus HPV e orientação do curso da doença caso confirmada (prognóstico do câncer), além de contribuir para o entendimento dos mecanismos do desenvolvimento do câncer e de novas formas de tratamento da doença.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (informações dos questionários e resultados dos seus exames) ficarão armazenados em pastas de arquivo e no computador pessoal, sob a responsabilidade dos pesquisadores Ingrid Tavares, Ana Karina Brizeno e Josélio Soares, no endereço Rua Fernando de Noronha, 81, 301, CEP: 50740-190, Várzea) pelo período mínimo de 4 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver

necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

(Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____,

CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo: “Expressão de metaloproteinases e Infecção pelo HPV como fatores prognósticos no desenvolvimento de neoplasias da tireoide” como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, _____/_____/_____.

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar (2 testemunhas não ligadas a equipe).

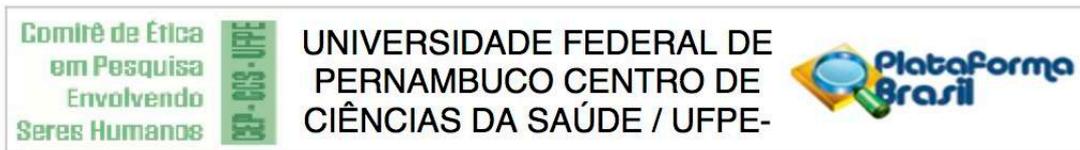
Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Anexo B



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES E INFECÇÃO PELO HPV COMO FATORES PROGNÓSTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE NEOPLASIAS DA

Pesquisador: Ingrid Tavares de Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47863515.0.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

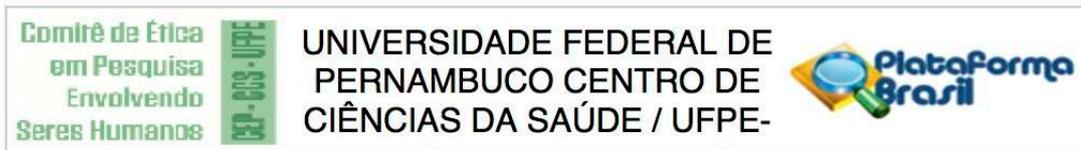
Número do Parecer: 1.214.998

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) que visa contribuir para o esclarecimento do processo carcinogênico na tireoide e indicar fatores prognósticos para o diagnóstico precoce e novas abordagens terapêuticas para neoplasias tireoidianas.

O câncer de tireoide é o mais comum do sistema endócrino, correspondendo a aproximadamente 1% dos casos de câncer diagnosticados. Afeta mais frequentemente mulheres, sendo que a maioria dos casos ocorre entre 25 a 65 anos de idade. A última estimativa mundial apontou a ocorrência de cerca de 300 mil novos casos, sendo 68 mil no sexo masculino e 230 mil no feminino. No Brasil, estimou-se para 2014 a soma de 1.150 casos novos para homens e 8.050 para mulheres. Há diversos tipos de neoplasias da tireoide que podem ser divididas em: adenomas (tumores benignos) e carcinomas (tumores malignos). Os carcinomas podem ser classificados como: diferenciados (papilar e folicular), moderadamente diferenciados (medular) e indiferenciados (anaplásico). Dentre estes, o carcinoma papilar constitui o tipo mais comum e é responsável por aproximadamente 83% dos casos de câncer de tireoide. A compreensão dos mecanismos moleculares, associações com vírus oncogênicos, expressão de proteínas e ativação de fatores de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



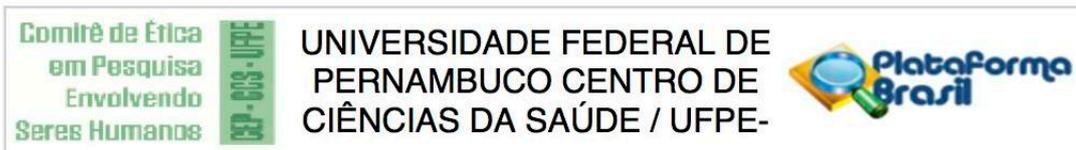
Continuação do Parecer: 1.214.998

transcrição envolvidos no desenvolvimento, progressão e metástase do câncer de tireoide, pode auxiliar a desenvolver novas estratégias para o diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento.

Alguns vírus apresentam grande potencial oncogênico, tendo relação direta com o desenvolvimento de determinadas neoplasias humanas, entre estes, destaca-se o Papilomavírus humano (HPV). A associação entre câncer cervical e infecção pelo HPV já é bem estabelecida e o DNA do HPV é detectado na maioria das amostras histológicas de cânceres invasivos. No entanto, diversos estudos tem demonstrado a relação do HPV com neoplasias em outros órgãos, como, por exemplo, em carcinomas pulmonares e de orofaringe. Embora seja um vírus epiteliotrópico e infecte principalmente células epiteliais escamosas, o HPV também pode acometer células glandulares, induzindo tumores. Diversas pesquisas tem confirmado a presença do DNA do HPV em neoplasias de tecidos glandulares como o mamário e o prostático. Atualmente existem aproximadamente 150 tipos de HPV que são classificados de acordo com a propensão das células infectadas à progressão maligna. Os sorotipos considerados de alto risco oncogênico são o HPV-16 e o HPV-18, estando associados a aproximadamente 73% dos cânceres malignos. Nos últimos anos a literatura vem reafirmando que a presença do HPV contribui para a iniciação e promoção de diversas lesões glandulares, porém, muito pouco foi investigado com relação à tireoide. Relação entre

A matriz extracelular (ECM) é crucial para o desenvolvimento e manutenção da estrutura normal dos tecidos. No processo de carcinogênese, as células neoplásicas promovem a degradação da ECM através da quebra proteolítica dos seus principais componentes, como colágeno e proteoglicanos. As enzimas responsáveis por essa atividade são as Metaloproteinases de Matriz (MMPs) que estão envolvidas em uma ampla gama de condições patológicas, incluindo a formação de tumores. Diversos estudos tem demonstrado que essas enzimas afetam desde os eventos iniciais da carcinogênese como invasão e progressão tumoral, até processos de metástase, recidivas e baixa taxa de sobrevivência em diversas neoplasias humanas. Nos carcinomas da tireoide, a superexpressão das metaloproteinases está relacionada a uma maior agressividade do tumor e elevado potencial metastático. A MMP-2 é uma das principais metaloproteinases ativas em neoplasias, além de ser um marcador de fenótipo maligno. Visto que os níveis de expressão apresentam relação com o estado clínico do paciente, esta MMP pode ser usada como indicador prognóstico. Altos níveis de MMP-2 já foram relatados em diversos carcinomas humanos, incluindo os de tireoide, sempre associado às variantes mais agressivas e metástases. O mesmo

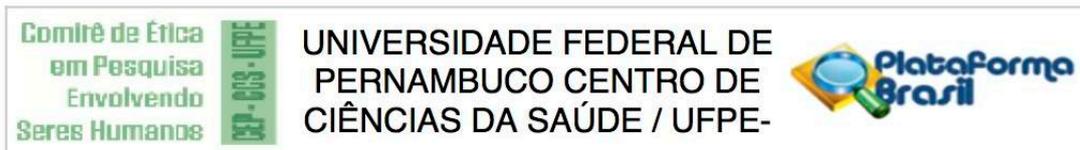
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.214.998

ocorre com a MMP-9, que tem se mostrado significativamente elevada em carcinomas de tireoide, e apresentado relação com aumento de tamanho do tumor e metástase para os linfonodos. O papel crucial da MMP-9 é na angiogênese tumoral, sua ativação aumenta a biodisponibilidade de fatores pró-angiogênicos. As atividades das MMPs são especificamente inibidas pelos Inibidores Teciduais de Metaloproteinasas (TIMPs), que constituem uma família de quatro membros (TIMP-1, 2, 3 e 4) e regulam MMPs através da inibição da protease endógena e da regulação da ativação da superfície celular. Os TIMPs também apresentam vários efeitos no crescimento celular, apoptose e diferenciação através de um mecanismo MMP-independente. TIMP-2 é capaz de induzir apoptose e inibir várias fases da angiogênese, logo, sua alta expressão impede o crescimento e a progressão de tumores, invasão e metástase. A redução de TIMP-1 e 2 é observada em diversos tipos de cânceres humano, incluindo os carcinomas papilares e medulares de tireoide, particularmente nos mais invasivos e metastáticos. Além das metaloproteinasas e seus inibidores, outras proteínas estão relacionadas aos processos carcinogênicos. O fator de transcrição Forkhead boxM1 (FoxM1) é responsável pelo controle da proliferação celular e é superexpresso em células neoplásicas. FoxM1 estimula vários genes relacionados a progressão do ciclo celular, oferecendo suporte a multiplicação de células tumorais e ativando diretamente genes envolvidos na metástase, além disso, induz expressão de metaloproteinasas. Já foi demonstrado que FoxM1 é superexpresso em carcinomas papilares da tireoide e significativamente associado a ativação de MMP-9 e MMP-2 e que sua inibição atenua a migração e invasão destas células neoplásicas. O Cluster of Differentiation 147 (CD147) é uma glicoproteína transmembrana que atua induzindo as células neoplásicas, fibroblastos próximos e células endoteliais a expressar metaloproteinasas, facilitando a invasão do tumor. Há evidências de níveis elevados de CD147 em carcinomas de tireoide, onde também induz aumento da expressão de MMP-3, 7 e 9. Análises imunohistoquímicas e imunocitoquímicas correlacionaram CD147 com o grau de dediferenciação em carcinoma papilar de tireoide e maior propensão à metástase, além disso, pacientes que apresentam menor expressão de CD147 tem melhores taxas de sobrevivência. Estas observações sugerem que essa proteína desempenha um papel crucial na atividade invasiva de carcinomas da tiroide. A remoção cirúrgica é a principal forma de tratamento para neoplasias tireoidianas com resultados geralmente favoráveis. No entanto, exige que os pacientes façam terapia de reposição hormonal ao longo da vida. Além disso, alguns pacientes desenvolvem metástases e recidivas, e este curso da doença é muitas vezes relacionado a uma pior evolução clínica. Entretanto, os marcadores que possam predizer menor risco de pacientes virem a sofrer esses problemas são escassos. Nos últimos anos, tem se observado que o HPV está envolvido no desenvolvimento de lesões malignas

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.214.998

em glândulas como a mama e próstata e que algumas proteínas, como: MMP-2 e 9, TIMP-1 e 2, FoxM1 e Cd147 têm sido associadas a várias etapas da carcinogênese e ao processo de metástase em neoplasias da tireoide.

Desta forma a pesquisa se propõe a investigar as correlações entre o quadro infeccioso por HPV e a expressão de metaloproteinases (MMPs), Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs), fator de transcrição Forkhead boxM1 (FoxM1) e Cluster of Differentiation 147 (Cd147) como possíveis fatores prognósticos que podem auxiliar no diagnóstico precoce das neoplasias da tireoide e contribuir no esclarecimento da sua carcinogênese.

Participarão do estudo 200 mulheres com lesões benignas e malignas da glândula tireoide, atendidas no setor de radiologia do Hospital das Clínicas (HC) da UFPE.

Serão incluídas no estudo pacientes com idade acima de 18 anos e que possuam resultados de exame de imagem apresentando possíveis lesões de tireoide confirmadas pelo teste histopatológico de rotina, que não iniciaram qualquer tratamento químico ou cirúrgico.

Serão excluídas pacientes que sejam portadoras do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), imunossuprimidas por outros fatores não relacionados ao HIV (doenças autoimunes, transplantadas) e pacientes vacinadas contra HPV (6, 11, 16, 18).

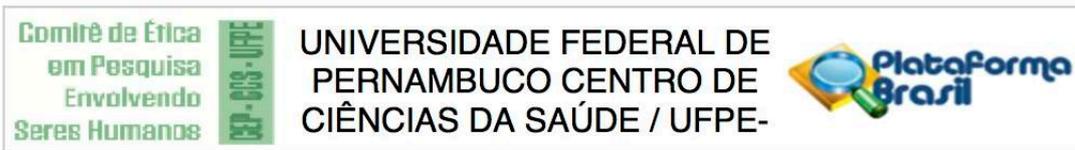
Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo primário avaliar expressão das metaloproteinases (MMPs), FoxM1 (fator de transcrição Forkhead boxM1), Cd147 (Cluster of Differentiation 147) e infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) como fatores prognósticos no desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas da tireoide e, por objetivos específicos: 1) identificar o nível de expressão de MMP-2 e MMP-9 e dos seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 em biópsias e punções de pacientes com adenomas e carcinomas de tireoide; 2) estabelecer as correlações entre as metaloproteinases com as proteínas CD147 e FoxM1 como marcadores prognósticos no desenvolvimento de neoplasias tireoidianas; 3) proceder genotipagem para o HPV em amostras de biópsia e punção de lesões da tiroide e identificar os sorotipos prevalentes e 4) investigar as associações entre a infecção pelo HPV e expressão das MMPs e seus respectivos inibidores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos advindos com a participação na pesquisa estão relacionados ao constrangimento em

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.214.998

responder ao questionário referente aos fatores de risco para desenvolvimento do câncer. A fim de minimizar esse desconforto, o pesquisador aplicará o questionário individualmente e explicará primeiramente do que se trata o projeto e a importância da colaboração da paciente para o estudo, deixando-a a vontade para decidir se deseja ou não fazer parte deste. Quanto às amostras utilizadas no projeto as mesmas serão resgatadas após a realização dos exames de rotina das participantes, não oferecendo nenhum risco adicional as mesmas.

Como benefício direto, as participantes do estudo serão retribuídas através da detecção e identificação de HPV nas lesões de possível progressão, bem como através do estudo da expressão das metaloproteinases e seus inibidores, obter um diagnóstico preventivo e prognóstico do câncer tireoidiano, além de contribuir para o entendimento dos mecanismos carcinogênicos e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Além disso, a compreensão dos mecanismos moleculares, associações com vírus oncogênicos, expressão de proteínas e ativação de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento, progressão e metástase do câncer de tireoide, pode auxiliar a desenvolver novas estratégias para o diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa relevante visto que nos últimos anos a literatura vem reafirmando que a presença do HPV contribui para a iniciação e promoção de diversas lesões glandulares, porém, muito pouco foi investigado com relação à tireoide. O estudo dessa possível associação poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares, associações com vírus oncogênicos, expressão de proteínas e ativação de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento, progressão e metástase do câncer de tireoide, podendo auxiliar a desenvolver novas estratégias para o diagnóstico precoce do câncer de tireoide, assim como para o prognóstico e tratamento.

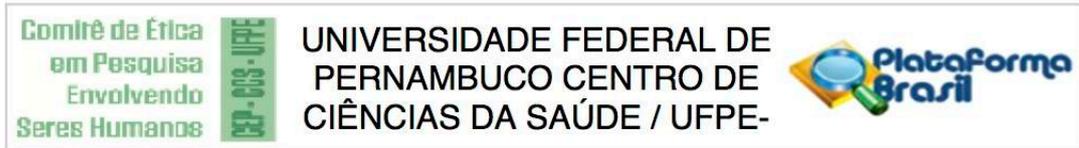
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória (carta de anuência da Gerente de Ensino e Pesquisa do HC; termo de compromisso e confidencialidade da pesquisadora; projeto completo; TCLE e Lattes dos pesquisadores envolvidos) foram anexados à Plataforma Brasil.

Recomendações:

Sem recomendações.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.214.998

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Lattes (Ingrid Tavares de Lima).pdf	21/07/2015 11:07:41		Aceito
Outros	Lattes (Mario Ribeiro de Melo-Júnior).pdf	21/07/2015 11:09:01		Aceito
Outros	Lattes (Jacinto da Costa Silva Neto).pdf	21/07/2015 11:10:28		Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

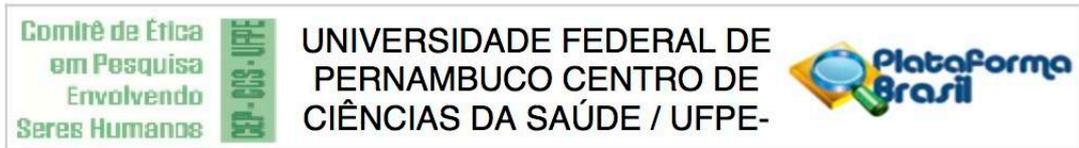
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.214.998

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_474559.pdf	21/07/2015 11:13:46		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	uso de dados.jpg	04/08/2015 10:07:25		Aceito
Outros	Termo confidencialidade.jpg	04/08/2015 10:08:07		Aceito
Outros	carta anuencia patologia.jpg	04/08/2015 10:08:53		Aceito
Outros	Carta anue¿ncia radiologia.pdf	04/08/2015 10:09:28		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.jpg	04/08/2015 10:05:49		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_474559.pdf	04/08/2015 10:13:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Doutorado Ingrid.docx	04/08/2015 15:39:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	04/08/2015 15:40:33		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_474559.pdf	04/08/2015 15:43:03		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 04 de Setembro de 2015

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

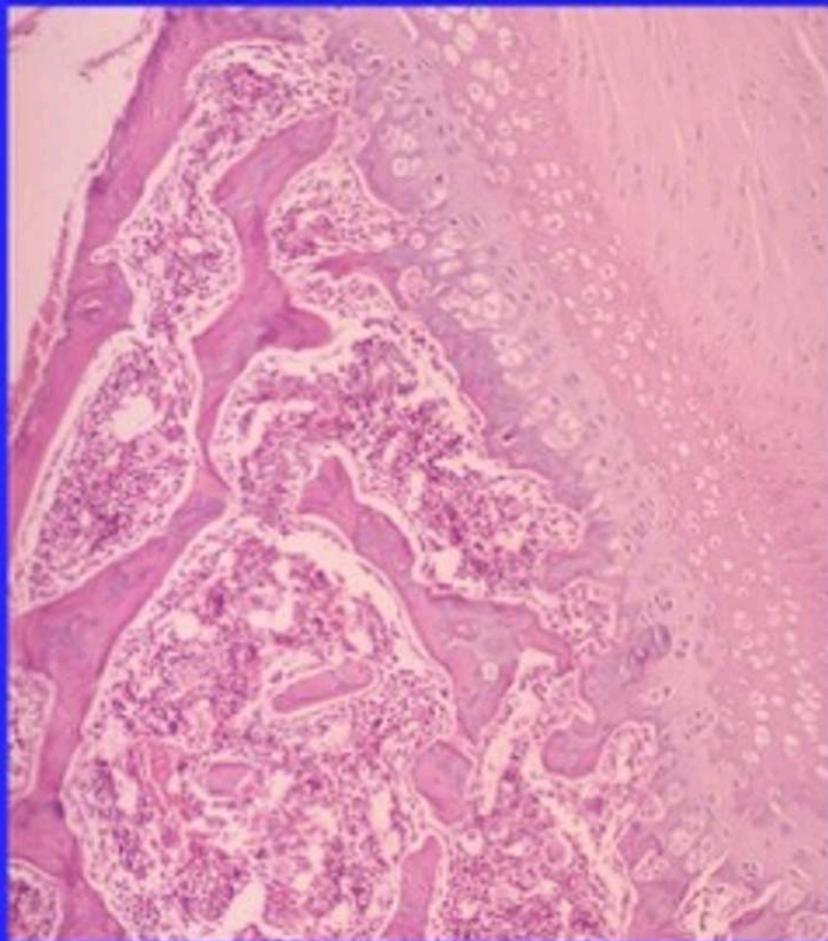
Anexo C

Experimental Pathology and Health Sciences

Research, Clinics, Teaching and Society

2015:7 (2)

Journal of the Portuguese Experimental Pathology Association



V Luso-Brazilian Congress of Experimental Pathology
XV International Symposium on Experimental Techniques

PRELIMINAR CLINIC EPIDEMIOLOGY PROFILE OF THYROID NODULES IN BRAZILIAN (RECIFE, PE)

INGRID TAVARES FRAGOSO¹; ANA KARINA BRIZENO FERREIRA LOPES²; CARLA TAÇILIA BEZERRA³; JÚLIA MARIA DANTAS FERREIRA³; MARIO RIBEIRO MELO-JUNIOR^{1, 2, 3}.

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE, Brazil; 2. Programa de Pós-graduação em Patologia, CCS/UFPE, Brazil; 3. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Abstract

Thyroid cancer is the most common endocrine cancer and mainly affects women. Papillary is the most common type of thyroid cancer and accounts for more than 83% of all thyroid malignancies. This study used questionnaires to profile of patients with thyroid nodules and to assess the risk factors associated with carcinogenesis. In addition, data obtained from cytological (FNA) complemented the history of each patient. The data obtained showed that the majority of patients were female. The Body Mass Index of the patients was calculated and most studied is presented in the overweight subgroup. Some patients had a family history of thyroid cancer and the major of patients residing in farms. A total of 115 nodes were studied, were benign lesions, lesions with atypia and diagnosis node of papillary carcinoma. Cancer is today, in Brazil, a public health problem, whose control and prevention should be prioritized.

Introduction

Thyroid cancer is the most common endocrine cancer and its incidence has continuously increased in the last three decades all over the world (Pellegriti et al., 2013). It affects women more often, and in most cases are between 25 to 65 years of age (Avalia, 2002). Thyroid cancer can be divided into papillary thyroid carcinomas, follicular, medullary, or anaplastic histological types. Papillary is the most common type of thyroid cancer and accounts for more than 83% of all thyroid malignancies (Meng et al., 2012). According to the National Cancer Institute (INCA-Brazil) changes in demographics, urbanization, industrialization and advances in science and technology has led the Brazilian people to new lifestyles and more intense exposure to risk factors for cancer. The incidence of thyroid cancer in Brazil is about 24 cases per 100,000 habitants (Rosario et al, 2013).

Materials and Methods

This study relies on the voluntary participation of patients enrolled in the radiology department of the University Hospital of the Federal University of Pernambuco, who have benign or malignant lesions of the thyroid. During the service is researching the history of the patient through a questionnaire in order to know the profile and presence of risk factors associated with carcinogenesis. The imaging tests (ultrasound) and cytologic findings, acquired through fine needle aspiration biopsy (FNA) are also analyzed, and the data added to the profile outlined by questionnaire.

Results The data obtained through questionnaires given to 68 patients, had the following results: the vast majority of patients were female (96.6%) and only 4.4% (3) males.

The ages ranged from 15-81 years, and the predominant age group between 30-59 years, which corresponds to 63.2% of patients (43). The predominant ethnic group is the puma, with 58% (40), followed by white, with 25% (17). Only 11.7% (8) declare themselves black. Regarding education, the majority of patients 57.3% (39) have not completed elementary school and only 3 patients (4.4%) have completed higher education. The Body Mass Index (BMI) of the patients was calculated and most studied is presented in the overweight subgroup (35.3%) - 27.9% had normal weight and 19.1% were obese. Only 8.8% (6) of respondents had a family history of thyroid cancer; and 14.7% (10) are medication related to thyroid, for everyone has been prescribed levothyroxine. About 29 (42.6%) of patients residing in the metropolitan area of Recife, while the majority (38 to 55.9%) lies within the state. A total of 115 nodes were studied, with 39 (57.4%) patients presenting only one nodule punched, 15 (22%) with 2 nodes, and 14 (20.6%) patients with three or more nodules. According to the Bethesda system of cytologic classification, cytological results showed 40.8% of unsatisfactory samples (47). Of satisfactory results (49 - 42.6%) were benign lesions (Bethesda II) (9 - 7.8%) lesions with atypia of undetermined significance (Bethesda III), (1 - 0.9%) with a diagnosis node of papillary carcinoma (Bethesda VI) and (1 to 0.9%) nodule with suspected malignancy (Bethesda V). Eight patients still lacked cytologic findings released from the pathology industry in the analysis of these data.

Discussion and Conclusion

As expected, most of the nodules were present in females. Studies suggest that hormonal factors may explain the

higher incidence of thyroid cancer in women (INCA, 2013). Based on recent data, thyroid cancer is the fifth most common cancer in women in the world, and in Italy is the second (Pellegriti et al., 2013). In northeastern Brazil, this cancer is the sixth most common female (INCA, 2013). The vast majority of patients in our study had low education, which may be related to the income of the same, as most reside in and are farmers, moreover, to have been carried out in public hospitals with unique patient care the Unified Health system (SUS). The difficulty of access to information also end in preventing cases, as many only carry out the tests after appearance of considerable size of nodules. Most patients lies with standard BMI (IMC) above normal. These findings may be related to some degree hormone thyroid gland dysfunction, which could lead to increased weight, such as hypothyroidism, but the lack of access to laboratory profile of patients limits this correlation. It can be estimated que at least 14.7% of patients are diagnosed with hypothyroidism, by making therapeutic use of levothyroxine. According to Kitahara et al. (2011) a strong correlation between obesity and cancer risk and mortality has been demonstrated for several malignancies and a pooled analysis of five prospective studies indicated that also the risk of thyroid cancer is greater in obese subjects. We observed that most patients reside in farms and works with agriculture. Zhang et al. (2008) says in the last decades, the population has been more exposed to environmental pollutants like asbestos, benzene and pesticides, all compounds that may act as either genotoxic or nongenotoxic carcinogens. These substances may induce abnormal thyroid cell proliferation, favoring a precancerous state. Genetic factors, environmental influences, and access to medical care can easily explain the high variability in the thyroid cancer incidence by geographic area and ethnicity. Recent reports indicated a similar age-specific trend by racial/ethnic groups. Although the lowest rates of thyroid cancer are observed in blacks (Aschebrook et al., 2013). This information supports our results showed that only 11.7% of the patients were black. The malignancy rate in patients with thyroid nodules patients is approximately 5%, our study found a confirmed case of malignancy and a suspected malignancy. Both the lump diagnosed as malignant as the suspect of malignancy, had as type papillary carcinoma. Studies showed increases in the incidence of the papillary histotype, with no significant change for the follicular, medullary, or anaplastic histotypes (Pellegriti et al., 2013). Papillary carcinoma of the thyroid is generally associated with slow growth and good prognosis. However, some cases show a relatively early recurrence, severe invasion, or multiple lymphnode metastasis, though their tumor size is small. It would be important to identify the characteristics of thyroid carcinoma that have such a high risk for invasion and metastasis (Maeta et al., 2001). With regard to genetics, there is a strong association with the development of thyroid cancer, mainly with the medullary type of thyroid cancer. Approximately 20% of cases are associated with an autosomal dominant gene. Our findings show that only 6 (8.8%) of the patients had a family history of thyroid carcinoma, but did not know estimate the histological type. In our research we found no patients with this subtype, probably due to small sample size, since this type is rarer. What could explain the absence of medullary cases in our research. Cancer is today, in Brazil, a public health problem, whose control and prevention should be prioritized. Thyroid cancer in the context of approaches to address this problem should include health education actions to strengthen the importance of prevention especially in women who are the target gupo this disease.

References

1. Avaluia, E. D. E. (2002). INCA. Revista Brasileira de Cancerologia, 48(2), 181-185.
2. Aschebrook-Kilfoy, B., Kaplan, E. L., Chiu, B. C., Angelos, P. and Grogan, R. H. "The acceleration in papillary thyroid cancer incidence rates is similar among racial and ethnic groups in the United States," *Annals of Surgical Oncology*, 2013.
3. INCA - Instituto Nacional do Câncer [homepage na

internet]. Brasil; 2013 [acesso em 05 de novembro de 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>

4. Kitahara, C. M., Platz, E. A., Beane F., "Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies," *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, vol. 20, no. 3, pp. 464-472, 2011.
5. Maeta, H., Ohgi, S., Terada, T. Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. *Virchows Archiv*, 438, 121- 128, 2001.
6. Meng, X. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase 9 (MMP9) papillary thyroid carcinomas. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(44), 3075-3079, 2012. doi:10.5897/AJPP12.919
7. Pellegriti, G., Scollo, C., Lumerà, G., Regalbuto, C., Vigneri, R., and Belfiore, A. "Clinical behavior and outcome of papillary thyroid cancers smaller than 1.5 cm in diameter: study of 299 cases," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 89, no.8, pp. 3713-3720, 2004.
8. Y. Zhang, G. L.Guo, X.Han et al., "Do polybrominated diphenylethers (PBDE) increase the risk of thyroid cancer?" *BioscienceHypotheses*, vol. 1, no. 4, pp. 195-199, 2008.