UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL

JANAINA REGINA LÉLLIS

**Caracterização da expressão da MMP-9, TIMP-1 e VEGF no
carcinoma papilífero da tireoide**

Ribeirão Preto
2021

JANAINA REGINA LELLIS

**Caracterização da expressão da MMP-9, TIMP-1 e VEGF no
carcinoma papilífero da tireoide**

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia
Experimental

Orientador: Prof. Dr. Edson Garcia
Soares

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Léllis, Janaina Regina

“Caracterização da expressão da MMP-9, TIMP-1 e VEGF no carcinoma papilífero da tireoide”. Ribeirão Preto, 2021.

97 f.: il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/ USP. Departamento de Patologia. Área de concentração: Patologia Experimental. Orientador: Soares, Edson Garcia.

1. Carcinoma papilífero da tireoide. 2. Metástase linfonodal. 3. Matriz extracelular. 4. MMP9. 5. TIMP1. 6. VEGF.

Nome: Léllis, Janaina Regina

Título: Caracterização da expressão da MMP-9, TIMP-1 e VEGF no carcinoma papilífero da tireoide.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.

Instituição:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha amada mãe **Sônia**, a minha doce avó **Áurea** e ao meu avô **Miguel** (in memorian), para que saibam que o laço de amor que nos une transcende toda a minha existência.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Ao meu querido orientador **Prof. Dr. Edson Garcia Soares**,*

Agradeço por toda confiança depositada em mim, por me acolher no momento em que mais precisei. Agradeço pelas boas xícaras de café, que foram sempre acompanhadas de ótimas conversas. Sou grata por todo ensinamento profissional e pessoal.

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** pelo dom da vida e pela dádiva que é viver. A toda **espiritualidade** que me guia pelo caminho da vida, auxiliando em todo meu processo de evolução.*

*À Prof^a. Dr^a. **Simone Gusmão Ramos** pelo apoio quando mais precisei e por ter disponibilizado a infraestrutura de seu laboratório, o qual contribuiu para realização desta dissertação.*

*A minha amiga e irmã **Letícia Passi Turra**, à qual eu jamais irei conseguir expressar o tamanho do meu amor e gratidão. A conclusão deste trabalho não seria possível sem você iluminando os meus dias. Sou e serei eternamente grata a Deus pela sua vida.*

*Às amigas que a FMRP-USP me concedeu: **Andressa Duarte, Bruna Amanda Rattis, Maiara Aldá, Sabrina Setembro, Suziene Cardoso**, agradeço a Deus por ter me dado a honra de conhecer vocês, sou grata por poder compartilhar parte da minha vida com vocês. Levo vocês sempre em meu coração*

*À querida técnica **Ana Maria da Rocha** por todos os ensinamentos, dedicação e pelas horas de conversas, que sempre alegraram os meus dias.*

*À secretária da pós-graduação do departamento de patologia **Camila Zambonini** por toda dedicação e cuidado ao longo desses anos.*

*À **CAPES**, pois o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.*

*E por último, mas não menos importante agradeço a todos os **pacientes** incluídos neste projeto e suas famílias que, mesmo através do sofrimento, permitiram-se a acreditar no futuro, na ciência, na medicina de precisão. Sem eles, certamente, este estudo não teria sido possível.*

EPÍGRAFE

“ Não quero ter vivido em vão como a maioria das pessoas. Quero ser útil e trazer alegria para as pessoas que vivem à minha volta e não me conhecem. Quero continuar viva, mesmo depois da morte”

Anne Frank

RESUMO

LÉLLIS, J.R. Caracterização da expressão da MMP-9, TIMP-1 e VEGF no carcinoma papilífero da tireóide. 2021. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

INTRODUÇÃO: É sabido que o carcinoma papilífero de tireoide (CPT) possui bom prognóstico, entretanto, alguns casos evoluem com um comportamento agressivo, ocasionando metástase de linfonodos cervicais e aumentando a recorrência local com diminuição da sobrevida. A matriz extracelular (MEC) fornece suporte às células tumorais e às células pertencentes ao microambiente, com papel crucial durante o processo de disseminação de tumores, especialmente pelo contato célula-célula e célula-matriz. Devido a sua capacidade de degradar a MEC, a MMP-9 e o TIMP-1 estão sendo relacionados com processos de migração, invasão e desenvolvimento metastático. Além disso, a MMP-9 demonstrou possuir papel importante na angiogênese tumoral, através da estimulação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). **OBJETIVO:** Avaliar a expressão imunoistoquímica dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF em lesão neoplásica de CPT e lesão neoplásica de metástase (linfonodo), bem como relacionar a expressão dos marcadores com os aspectos clínico-patológicos. Tem-se ainda como objetivo correlacionar o tempo de progressão da doença com os aspectos clínico-patológicos e os marcadores de interesse. **METODOLOGIA:** Os 26 pacientes pertencentes aos estudos foram divididos em dois grupos nos quais avaliamos lesão neoplásica primeira (CPT) e lesão neoplásica metastática (ML). Durante a análise do laudo anatomo-patológico, observamos que 11 pacientes possuíam o diagnóstico de tireoidite de Hashimoto (HT) em associação ao CPT. Após revisão e seleção de blocos representativos, as amostras foram submetidas à técnica de imunoistoquímica. **RESULTADOS:** Ao analisar a expressão dos marcadores nos grupos CPT e ML, não identificamos diferenças estatísticas significativas. Entretanto, quando analisamos a expressão dos marcadores com os aspectos clínico-patológicos, encontramos diferença estatística em relação à expressão de MMP-9 e o tipo histológico ($p=0,04$), TIMP-1 ao sexo e recidiva ($p=0,04$ e $p=0,05$ respectivamente) e o VEGF

apresentou diferença em relação a pacientes que apresentaram HT em associação ao CPT. Identificamos diferença significativa na análise de sobrevida (progressão) em relação à MMP-9 no grupo ML, no qual pacientes que expressaram marcação moderada apresentaram tempo médio de progressão menor de 4,31 anos ($p=0,02$), com risco de 1,25 vezes maior ($p=0,03$). **CONCLUSÃO:** Observamos que a expressão de MMP-9, TIMP-1 e VEGF não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os grupos. Entretanto, encontramos diferenças em relação aos marcadores quando confrontados com os parâmetros clínico-patológicos, o que poderá servir como auxílio para futuras investigações sobre a compreensão das interações do CPT e no monitoramento dos pacientes.

Palavras-Chave: Carcinoma papilífero da tireoide. Metástase linfonodal. Matriz extracelular. MMP9. TIMP1. VEGF.

ABSTRACT

LÉLLIS, J.R. Characterization of the expression of MMP-9, TIMP-1 and VEGF in papillary thyroid carcinoma. 2021. 97f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

INTRODUCTION: It is known that thyroid papillary carcinoma (TPC) has a good prognosis, however, some cases evolve with an aggressive behavior, leading to cervical lymph nodes metastasis and increasing local recurrency with reduced survival. The extracellular matrix (ECM) provides support to the tumoral cells and to cells belonging to the microenvironment, with a crucial role during the process of tumor dissemination, specially through cell-to-cell and cell-to-matrix contact. Due to its capacity to degrade the ECM, the MMP-9 and the TIMP-1 are being related to migration processes, invasion, and metastatic development. Besides that, the MMP-9 demonstrated to have an important role in tumoral angiogenesis, through the stimulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF). **OBJETIVE:** To evaluate the immunohistochemical expression of the markers MMP-9, TIMP-1 and VEGF in TPC neoplastic lesion and metastasis neoplastic lesion (lymph nodes) as well as to relate the markers expression with clinic-pathologic aspects. It is also an objective to correlate the time of the disease progression with the clinic-pathologic aspects and the markers of our interest. **METHODOLOGY:** The 26 patients from the studies were divided in two groups in which we evaluated primary neoplastic lesion (TPC) and metastatic neoplastic lesion (ML). During the analysis of the anatomo-pathological report, we observed that 11 patients had a diagnosis for Hashimoto's Thyroiditis in association to TPC. After review and selection of representative blocks, the samples were submitted to the immunohistochemical technique. **RESULTS:** When we analyzed the markers expression in the TPC and ML groups, we did not identify significant statistical differences. However, when we analyzed the markers expression with the clinical-pathological aspects, we found a statistical difference regarding MMP-9 expression and the histological type ($p=0,04$), TIMP-1 to sex and relapsing ($p=0,04$ and $p=0,05$ respectively) and the VEGF presented difference regarded to patients who presented HT in association to TPC. We identified a significant difference in the analysis of survival (progression) regarding to MMP-9 in the ML group, in which

patients that expressed moderate expression presented an average progression time lower than 4,31 years ($p=0,02$), with a risk 1,25 times higher ($p=0,03$). **CONCLUSION:** We observed that the expression of MMP-9, TIMP-1 and VEGF did not present significant statistical differences between the groups. However, we found differences regarding the markers when confronted with the clinical-pathological parameters, which might serve as support to future investigations about the comprehension of TPC interactions and patients monitoring.

Keywords: Thyroid papillary carcinoma. Lymph node metastasis. Extracellular matrix. MMP9. TIMP1. VEGF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC/UICC	American Joint Committee on Cancer/ International Union against Cancer
ATA	American Thyroid Association
BSA	Bovine serum albumin
CAFs	Fibroblastos associados ao tumor
CPT	Carcinoma papilífero da tireoide
DAB	Diaminobenzidine
EMT	Transição epitélio mesenquimal
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina- Eosina
HT	Tireoidite de Hashimoto
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MB	Membrana basal
MDSCs	Células supressoras derivadas de mieloides
MDSCs- PMN	Granulocítica ou polimorfonucleares
MDSCs- M	Monocíticas
MEC	Matriz extracelular
ML	Metástase linfonodal
MT-MMP	Metaloproteinases da matriz do tipo membrana
MMP	Metaloproteinases da matriz
PBS	Salina tamponada com fosfato
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinases

TME	Microambiente tumoral
TNM	Tumor Nódulo Metástase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificação das MMPs e seus substratos
- Tabela 2.** Relação de anticorpos utilizados na técnica de imunoistoquímica
- Tabela 3.** Descrição das características clínico-patológicas do estudo
- Tabela 4.** Distribuição da expressão imunoistoquímica de MMP-9 nos grupos CPT e ML
- Tabela 5.** Distribuição da expressão imunoistoquímica de TIMP-1 nos grupos CPT e ML
- Tabela 6.** Distribuição da expressão imunoistoquímica de VEGF nos grupos CPT e ML
- Tabela 7.** Comparação entre as características clínico-patológicas em relação ao marcador MMP-9
- Tabela 8.** Comparação entre as características clínico-patológicas em relação ao marcador TIMP-1
- Tabela 9.** Comparação entre as características clínico-patológicas em relação ao marcador VEGF
- Tabela 10.** Associação da análise de sobrevida com os parâmetros clínico-patológicos
- Tabela 11.** Modelo de Cox bruto associado os parâmetros clínico patológicos
- Tabela 12.** Análise da sobrevida de acordo com a imunomarcção de MMP-9, TIMP-1 e VEGF
- Tabela 13.** Modelo de Cox bruto associado aos marcadores
- Tabela 14.** Modelo associado à análise de sobrevida: Cox ajustado

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Localização anatômica dos compartimentos de linfonodos cervicais
- Figura 2.** Estrutura e domínio das MMPs
- Figura 3.** Participação das moléculas de VEGF nos processos tumorigênicos
- Figura 4.** Participação da MMP-9 no câncer
- Figura 5.** Fluxograma do delineamento amostral
- Figura 6.** Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica da MMP-9
- Figura 7.** Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica do TIMP-1
- Figura 8.** Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica do VEGF
- Figura 9.** Construção de curvas Klaplan-Meier para parâmetros clínico-patológicos
- Figura 10.** Construção de curvas de Klaplan-Meier para parâmetros clínico- patológicos
- Figura 11.** Construção de curvas de Klaplan-Meier para MM-9 e TIMP-1 no grupo CPT e no grupo ML
- Figura 12.** Construção de curvas de Klaplan-Meier para VEGF no grupo CPT e no grupo ML

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Carcinoma papilífero da tireoide	20
2.2 Matriz extracelular	24
2.4 Matriz extracelular e o câncer	26
2.5 Microambiente Tumoral	27
2.6 Metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais: considerações gerais	30
2.7 MMP-9 e seu inibidor tecidual TIMP-1 no câncer	34
2.8 Participação do VEGF no desenvolvimento metastático	35
2.9 MMP-9 no desenvolvimento metastático	37
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. OBJETIVO GERAL.....	41
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5. METODOLOGIA	42
5.1 Casuística	42
5.2 Análise Imunoistoquímica	44
5.3 Análise das células Imunomarcadas por MMP-9, TIMP-1, VEGF	45
5.4 Análise estatística	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1 Análise descritiva dos aspectos clínico-patológicos	47
6.2 Análise imunoistoquímica dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF	49
6.3 Comparação da expressão dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF com os aspectos clínico-patológicos	55
6.4 Análise da relação entre a progressão com os aspectos clínico-patológicos e os marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF.	64
7. DISCUSSÃO	73
8. CONCLUSÃO	83
9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO	94
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP	94
ANEXO B – Classificação de Estadiamento TNM 7º edição	97

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é um tumor bem diferenciado, comum dentro dos cânceres de tireoide (CT), correspondendo cerca de 80% dos casos, com incidência em mulheres e na população adulta jovem abaixo dos 45 anos (LIMA, 2019; YWATA DE CARVALHO; CHULAM; KOWALSKI, 2015). O CPT é caracterizado por crescimento lento com excelente prognóstico e alta taxa de sobrevida, entretanto, pode evoluir para um comportamento agressivo com invasão local, ocasionando metástases para linfonodos cervicais, aumentando a mortalidade (ZHANG et al., 2013; LIMA, 2019).

Os tumores não são apenas massas de células malignas, mas sim estruturas complexas organizadas, onde muitas outras células são recrutadas para sua manutenção como células estromais, vasos sanguíneos, células inflamatórias e de inúmeras outras moléculas associadas. A comunicação intercelular é mediada por uma rede complexa de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas inflamatórias e remodelamento da matriz, ocasionando as principais alterações das propriedades físicas e químicas do tecido (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).

De modo geral, a matriz extracelular (MEC) caracteriza-se por seus aspectos dinâmicos, com constantes remodelações reguladas cuja orquestração é precisa e crucial, para a manutenção da sua função normal. A MEC fornece suporte para células no microambiente tumoral, e ainda desempenha papel dinâmico na evolução e disseminação de cânceres, especialmente pelo contato célula-matriz. Fatores chaves de crescimento como fatores angiogênicos e quimiocinas fazem parte de sua composição. A homeostase tecidual da MEC é mediada pela secreção coordenada das metaloproteinases de matriz (MMPs), e contrabalanceada pelos seus inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012)

As MMPs são enzimas proteolíticas que estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo o câncer, com capacidade de degradar e remodelar os componentes da MEC e da membrana basal (MB), bem como

regular a atividade de outras proteinases, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e receptores celulares (MENG et al., 2014). A degradação da MEC em torno das células tumorais é uma etapa essencial no processo da tumorigênese, e a participação das MMPs está relacionada com invasividade, processo de angiogênese e metástases. O rearranjo da MEC e seu microambiente irá favorecer a expansão do tecido normal em tumoral, onde as MMPs são mediadoras dessas alterações, estando presentes desde etapas iniciais até os estágios mais tardios do câncer (ZHANG et al., 2017).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma papilífero da tireoide

A glândula tireoide é responsável pela produção de hormônios essenciais a vida humana. Anatomicamente possui dois lobos, direito e esquerdo, dividida por uma fina região chamada istmo e sua localização dá-se na região cervical anterior. Seu epitélio é formado por meio de camada única de células cuboides, chamadas de células foliculares que são encarregadas de produzir dois hormônios, o triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4) (NACHIAPPAN *et al.*, 2014). Os folículos tireoidianos são formados por meio da organização em círculos destas células, que constituem a unidade anatomo funcional, tendo em seu interior o armazenamento de coloide, substância de aspecto gelatinoso rico em tireoglobulina. Outro tipo celular encontrado são as células parafoliculares ou células C, responsáveis por atuar na síntese de hormônio calcitonina (NACHIAPPAN *et al.*, 2014).

De todo o sistema endócrino, o câncer de tireoide (CT) é o mais comum, afetando em sua grande parte o sexo feminino (GUARINO *et al.*, 2010). A grande maioria dos CTs possuem origem a partir do epitélio folicular como o papilífero folicular e anaplásico, já o carcinoma medular é originário das células C. Devido aos CTs abrigarem um grupo de tumores significativamente diferentes, foram classificados de acordo com grau de diferenciação em bem diferenciados (carcinoma papilífero e folicular), pouco diferenciado (carcinoma medular) e indiferenciado (anaplásico). Os tumores bem diferenciados apresentam melhor prognóstico, diferente dos tumores pouco diferenciados e indiferenciados, que são de pior prognóstico (SIPOS; MAZZAFERRI, 2010).

Dentro da categoria de tumores bem diferenciados, existem diversos subtipos ou variantes histológicas. Essas classificações de subtipos de tumores ocorreram devido a evidências de que as características do núcleo das células eram mais importantes do que a arquitetura do tumor. Com isso, muitos tumores que eram classificados como foliculares, passaram a ser categorizados como variantes foliculares (HEDINGER; WILLIAMS; SOBIN, 1989).

Entre as neoplasias da glândula tireoide a de maior predomínio é o carcinoma papilífero da tireoide (CPT), correspondendo a cerca de 80% dos casos (CRAMER *et al.*, 2010). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de tireoide configura umas das neoplasias mais frequentes, sendo a de 5º maior incidência no sexo feminino com 11.950 casos (5,4%). De acordo com dados do INCA a estimativa da incidência no ano de 2020 é de 1,88 – 4,10 casos a cada 100,000 homens, enquanto a taxa estimada para mulheres fica em torno de 9,66 – 23,27 para cada 100,000 mulheres (INCA 2021).

Mesmo com excelente prognóstico, cerca de 20% dos casos evolui com comportamento agressivo e recorrência, com risco de mortalidade. O comportamento desse tumor pode ser complexo e variado, podendo ocasionar metástases de linfonodo cervical, com diminuição de sobrevida (ZHANG *et al.*, 2017).

Na maioria dos casos o tratamento de escolha abordado é cirúrgico, por meio de duas possíveis abordagens, parcial ou com a retirada total da glândula. De acordo com a diretriz da *American Thyroid Association (ATA)* para diagnóstico e tratamento de nódulos tireoidianos e carcinomas da tireoide, a tireoidectomia subtotal ou total é o principal procedimento cirúrgico, e nos últimos anos, a tireoidectomia total tem ganhado mais espaço por ser considerada como método mais seguro. A diretriz ainda dispõe sobre a dissecação eletiva ou profilática de linfonodos cervicais (HAUGEN *et al.*, 2016) .

Durante muito tempo metástases linfonodais não eram identificadas em carcinomas bem diferenciados (HAUGEN *et al.*, 2016; LANG *et al.*, 2007). Com isso, uma metástase de linfonodo cervical mínima poderia não apresentar achados anormais no exame pré-operatório, mas encontrada em exames patológicos no pós-operatório (YWATA DE CARVALHO; CHULAM; KOWALSKI, 2015).

No CPT normalmente o compartimento central do pescoço (nível VI) é o primeiro alvo de metástase. É sugerido que em casos de metástase diagnosticada clinicamente ou por exame de imagem, a dissecação dos linfonodos do compartimento central seja realizada (GUARINO *et al.*, 2010).

A cirurgia profilática traz como principal benefício a melhora na redução do risco de recorrência, diminuição do risco de complicações oriundas de reoperações e aumento da taxa de sobrevida global. Como desvantagem, complicações decorrentes de hipoparatiroidismo e lesão do nervo laríngeo são relatadas (HAUGEN *et al.*, 2016; YWATA DE CARVALHO; CHULAM; KOWALSKI, 2015; ZHANG *et al.*, 2017).

Faz parte do compartimento central (nível VI) a paratireoide, linfonodos pré-traqueais, paratraqueais e peritraqueais (figura 1). É definido como esvaziamento de linfonodos centrais ao nível VI do pescoço, a excisão sistemática dos linfonodos, que pode ser unilateral ou bilateral. Nas cirurgias profiláticas este procedimento é feito sob ausência de anormalidades linfonodais que sejam detectadas através de exames clínicos e de imagem (YWATA DE CARVALHO; CHULAM; KOWALSKI, 2015).

Figura 1. Localização anatômica dos compartimentos de linfonodos cervicais.

Fonte: Adaptado de (HAUGEN *et al.*, 2016).

Grande parte das metástases linfonodais é diagnosticada durante exploração cirúrgica, sendo tratada, como indicação terapêutica, a dissecação dos linfonodos acometidos. Neste cenário, o esvaziamento de linfonodos está associado a menores taxas de recorrências e melhores taxas de sobrevida. Dificilmente metástase do compartimento central é detectada em exame pré-operatório por métodos habituais utilizados ou por meio da palpação (GARREL *et al.*, 2011)

Os carcinomas considerados como micropapilares (< 1,0cm) também possuem a capacidade de gerar metástases linfonodais. A ultrassonografia pré-operatória e a exploração intra-operatória demonstraram baixa sensibilidade na detecção de metástases linfonodais, onde linfonodos positivos foram identificados posteriormente em exames patológico em cerca de 67% de pacientes (YWATA DE CARVALHO; CHULAM; KOWALSKI, 2015).

Segundo a ATA, a recomendação do procedimento de dissecação de linfonodos deve ocorrer em pacientes previamente diagnosticados com metástases linfonodais e com tumores classificados como de alto risco. Tumores não invasivos e menores, que aparentemente não apresentem linfonodos acometidos, devem ser avaliados individualmente em relação ao risco-benefício (HAUGEN *et al.*, 2016).

Até o presente momento, os dados quanto à comprovação dos benefícios da cirurgia profilática em diminuir a recorrência de tumores possuem limitações, o que os torna insuficientes. Para que o benefício da dissecação de linfonodo seja realizado, não se deve apenas tomar como base o risco de metástases ocultas ou na possibilidade de recidivas, uma avaliação global cuidadosa de cada paciente deve ser realizada, evitando os possíveis riscos de complicações decorrentes ou não de processos cirúrgicos (ODA *et al.*, 2016).

Em alguns casos após a cirurgia, a terapia adjuvante com radioiodo (iodo131) é indicada com objetivo de destruir tecido tireoidiano normal remanescente que possa se tornar maligno ou que contenha malignidade microscópica residual. As condições clínicas dos pacientes devem ser avaliadas para indicação de tratamento com radioiodo. Informações sobre o procedimento cirúrgico tal como extensão da cirurgia, presença de doença

residual, metástase e complicações devem ser mencionadas, bem como o laudo anatomopatológico disponível (HAUGEN et al., 2016; TUTTLE *et al.*, 2010).

2.2 Matriz extracelular

É uma estrutura complexa e orquestrada, que é considerada como um componente não celular que está presente em todos os tecidos (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012). É composta por diversos tipos de macromoléculas como proteínas glicolisadas denominadas de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, proteínas fibrosas como colágenos e elastina que possuem funções estruturais, além de proteínas com propriedades adesivas como as lamininas, tenascina e fibronectinas (MIAO *et al.*, 2017).

A MEC engloba todo o material contido entre o tecido conjuntivo e a MB, tornando-se uma matriz especializada em forma de lâmina que funciona como um arcabouço físico, com papel fundamental na regulação de diversos eventos do comportamento celular como proliferação, migração e diferenciação, adesão e sobrevivência (JABŁOŃSKA-TRYPUĆ; MATEJCZYK; ROSOCHACKI, 2016; SZARVAS *et al.*, 2011). A MB é parte da MEC especializada que possui estruturas elásticas, sendo grande parte constituída por colágeno do tipo IV e VII, proteoglicanos, heparan sulfato e condroitin sulfato, além de glicoproteínas como fibronectina e laminina. A principal função da MB é servir como ancoragem para as células epiteliais, separando-as do tecido conjuntivo adjacente (THEOCHARIS et al., 2016).

O colágeno é a proteína mais abundante encontrada na MEC, correspondendo a cerca de 30% do seu total. Constituem uma família de proteínas que são produzidas por diversos tipos celulares, que se distinguem quanto sua composição química, características morfológicas, distribuição e funções (GORDON; HAHN, 2010; LI *et al.*, 2020).

São classificados de acordo com sua estrutura e função. Os colágenos do tipo I, II, III, V, XI são denominados como colágenos fibrilares por se agregarem para formar fibras longas de colágeno. O colágeno do tipo I é o

mais abundante e está largamente distribuído pelo organismo e apresenta estrutura clássica de fibrilas de colágeno, constituindo a estrutura de ossos, dentina, tendões, capsulas de órgãos e a derme (EGEBLAD; RASCH; WEAVER, 2010). Os colágenos associados às fibrilas são formados por estruturas curtas, responsáveis por ligar as fibrilas de colágenos umas às outras, e a outras estruturas da MEC. Fazem parte deste grupo os colágenos do tipo IX, XII, XIV (LI *et al.*, 2020).

O colágeno do tipo IV é o principal componente da MB, e faz parte dos colágenos formadores de rede. Nesse tipo de colágeno as moléculas se associam e formam uma rede, tornando-se o principal componente estrutural que exercerá papel de aderência e de filtração (GORDON; HAHN, 2010). O colágeno do tipo IV liga-se diretamente com a superfície de células epiteliais, através de interações com outras proteínas da MEC como laminina e colágeno do tipo VII (colágeno de ancoragem), e por outro lado, também está ligada a matriz diretamente pelo colágeno do tipo I ou por outras proteínas presentes (LI *et al.*, 2020).

A laminina-5 representa o maior substrato insolúvel de ancoragem dos filamentos celulares, conectando as células epiteliais ao colágeno do tipo IV na MB, formando um complexo de adesão epitelial corresponde à contraparte dos hemidesmosomos na MB, sendo o tipo mais comumente produzido por células epiteliais (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010; AKHAVAN *et al.*, 2012; THEOCHARIS *et al.*, 2016).

A interação entre esses componentes da MEC pode conferir propriedades de controle das atividades celulares como migração, diferenciação, proliferação, apoptose e expressão genica. A matriz extracelular é uma estrutura altamente dinâmica que passa constantemente por remodelação, enzimaticamente ou não enzimaticamente, cujos componentes moleculares sofrem uma infinidade de alterações pós-traducionais (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

2.4 Matriz extracelular e o câncer

Como a MEC é considerada uma barreira natural, durante o processo da tumorigênese é necessário que sua degradação seja feita para que a progressão do tumor ocorra (RICCI; BRUZZESE; DI CARLO, 2015).

Nos tecidos epiteliais, as células são mantidas juntas e organizadas por meio de junções intercelulares e junções aderentes à MB, ancoradas por hemidesmossomos e filamentos intermediários associados a integrinas e actina. As células tumorais possuem a capacidade de desfazer essas junções célula-célula e célula-matriz, induzindo o estroma a agir de forma reativa facilitando a progressão do tumor (GIUSSANI *et al.*, 2015; BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

Após o rompimento da aderência das células e da MB por ação de enzimas proteolíticas, as células tumorais migram através destas regiões da MB disfuncional, tendo fácil acesso ao estroma e vasos sanguíneos e/ou linfáticos. As células do estroma adjacente também são quimioatraídas para o ambiente tumoral, contribuindo para desorganização tecidual e secreção de enzimas proteolíticas (THEOCHARIS *et al.*, 2016).

Durante a tumorigênese, a MEC torna-se desregulada e desorganizada, sendo resultado da progressão da doença. No desenvolvimento tumoral a matriz é regulada de modo aberrante e de maneira dinâmica anormal, sendo produzida excessivamente e/ou desorganizada em sua estrutura, por uma desregulação de enzimas de remodelação como as MMPs (JABŁOŃSKA-TRYPUĆ; MATEJCZYK; ROSOCHACKI, 2016).

A principal causa de morte por câncer é devido a sua capacidade de disseminar-se para outros órgãos (CLARK; VIGNJEVIC, 2015; SZARVAS *et al.*, 2011). Durante a formação de nichos metastáticos, a MEC pode apresentar papel fundamental, uma vez que as células tumorais são capazes de induzir a degradação das estruturas da MEC para serem disseminadas de lesões primárias e conseguirem intravasão vascular (KAUSHIK *et al.*, 2019).

O intravasamento é o passo subsequente, onde as células tumorais invadem vasos sanguíneos e/ou linfáticos, sendo transportadas para sítios

secundários. O extravasamento ocorre quando saem de circulação e migram para o tecido, criando seu próprio ambiente (CLARK; VIGNJEVIC, 2015). Para que tais eventos ocorram, a MEC precisa sofrer adaptações de forma dinâmica, com isso, a interação entra a matriz e o tumor desempenha papel crítico não só na formação, mas também durante o desenvolvimento metastático (THEOCHARIS *et al.*, 2016).

A homeostase tecidual da MEC é mediada pela secreção coordenada das MMPs e contrabalanceada pelos seus inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) (JABŁOŃSKA-TRYPUĆ; MATEJCZYK; ROSOCHACKI, 2016). Embora as MMPs sejam relacionadas com a invasão tumoral, alguns estudos sugerem que elas também estão envolvidas com os estágios iniciais da tumorigênese, sendo este efeito não relacionado com suas propriedades de degradação da MEC, mas sim com processos de angiogênese (MIAO *et al.*, 2017).

2.5 Microambiente Tumoral

A composição do microambiente tumoral (TME) é variada, sendo formado por componentes celulares e não celulares. Além das células tumorais, fazem parte do TME uma variedade de células, vasos sanguíneos, células estromais e células inflamatórias, e inúmeras outras moléculas associadas ao tecido. É através das diferentes células presentes no TME que podemos compreender as características biológicas de um tumor (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).

A relação entre as células tumorais e o estroma associado é crucial na iniciação e progressão tumoral, uma vez que a característica de heterogeneidade de tumores baseia-se não somente no perfil genômico e epigenômico, mas também em sua estrutura microambiental (GUARINO *et al.*, 2010).

As células tumorais imitem sinais que irão favorecer o crescimento e a progressão do tumor, quando o TME irá mudar em resposta através de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas inflamatórias e

remodelamento da matriz, ocasionando as principais alterações das propriedades físicas e químicas do tecido (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; ZHANG *et al.*, 2017; LORENZO-SANZ; MUÑOZ, 2019).

Essa sinalização irá assegurar a proliferação, sobrevivência e invasão de células tumorais, favorecendo o desenvolvimento de metástases. Portanto, é evidente a participação essencial do TME durante a iniciação do tumor, bem como em sua progressão e até na evolução da resposta terapêutica (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012).

Grande parte dos estudos realizados nos últimos anos foi voltada para compreensão de mecanismos intrínsecos às células tumorais, como genéticos e epigenéticos. Atualmente têm surgido cada vez mais diversos estudos voltados para compreensão de mecanismos extrínsecos a células tumorais, como os mediados pelo TME e sua influência no desenvolvimento da progressão tumoral (HASHIMOTO *et al.*, 2013). Vários grupos celulares de células do sistema imune estão sendo descritas na literatura como células que melhor contribuem para rede imunossupressora de tumor (BINNEWIES *et al.*, 2018).

Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) estão associados a piores prognósticos quando encontrado em abundância no TME, e nos tumores de tireoide, encontraram-se aumentados, correlacionando positivamente com as metástases linfonodais (GALDIERO; VARRICCHI; MARONE, 2016). De acordo com o estado de polarização e papel funcional, os macrófagos podem ser classificados em dois subtipos: fenótipo clássico M1, ou fenótipo alternativo M2 (HASHIMOTO *et al.*, 2013).

No ambiente tumoral, os TAMs estão associados ao crescimento, angiogênese e progressão tumoral, atuando por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias. Os TAMs imunossupressores promovem a alta expressão de MMPs, capazes de favorecer a invasão celular e metástase, devido a um remodelamento MEC, alteração do contato célula-célula e indução da ruptura da membrana basal (MB) (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012; BINNEWIES *et al.*, 2018; HASHIMOTO *et al.*, 2013).

Outro grupo celular encontrado no TME, o qual possui grande importância na progressão do tumor evitando a resposta do hospedeiro, são as células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs) (GALDIERO; VARRICCHI; MARONE, 2016). O surgimento dessas células é consequência da mielopoese aberrante associada ao tumor, e elas são funcionalmente definidas como células mieloides imaturas imunossupressoras. São conhecidas duas populações descritas como principais: MDSCs granulocítica ou polimorfonucleares (PMN- MDSCs) e MDSCs monocíticas (M- MDSCs) (LORENZO-SANZ; MUÑOZ, 2019).

No TME, as MDSCs também induzem uma expressão maior de MMPs, especialmente a MMP-9 considerado como fator pró-metastático, aumentando capacidade de invasão de células tumorais e desenvolvimento de metástases (KIM *et al.*, 2013; LORENZO-SANZ; MUÑOZ, 2019).

A ligação do processo de inflamação crônica e os tumores de tireoide são reconhecidos há décadas (COPERCHINI *et al.*, 2019). O processo de inflamação é uma resposta benéfica que é ativada para controlar e restaurar lesões nos tecidos decorrentes de injúrias. Entretanto, se não houver regulação o processo inflamatório pode se tornar crônico, tornando-se o ambiente propício para auxiliar no desenvolvimento de malignidade (LANDSKRON *et al.*, 2014).

A presença de moléculas bioativas de células imunes que estão presentes no TME como citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, aumentam a proliferação e a biodisponibilidade de fatores pró-angiogênicos, além de enzimas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) que remodelam a MEC e contribuem para promover a transição do epitélio mesenquimal (EMT) (HASHIMOTO *et al.*, 2013; LANDSKRON *et al.*, 2014)

A tireoidite de Hashimoto (HT) é uma doença inflamatória autoimune da tireoide, caracterizada por infiltração generalizada de linfócitos, fibrose, atrofia parenquimatosa e também a causa mais comum de hipotireoidismo (GUARINO *et al.*, 2010). O desenvolvimento de câncer em local de inflamação crônica foi proposto por Virchow em 1863 e, desde então, o papel da inflamação crônica

ocasionando a transformação neoplásica tornou-se um fenômeno conhecido (AHN *et al.*, 2011).

A associação de HT com CPT foi proposta por Dailey em 1955, porém a relação entre ambos ainda não está bem elucidada (DAILEY; LINDSAY; SKAHEN, 1955). O papel das células inflamatórias é diverso, sendo capazes de gerar mecanismos de escape favorecendo a atividade pró-tumoral, bem como excitar o crescimento celular tornando-os suscetíveis a ação de agentes mutagênicos, e ainda, estimular o desenvolvimento de células tronco tumorais (CSCs) (BERGDORF *et al.*, 2019).

2.6 Metaloproteinases de matriz e seus inibidores teciduais: considerações gerais

As MMPs constituem uma família de endopeptidases dependentes de zinco, capazes de degradar moléculas da BM e da MEC, desempenhando papel crucial em diversos processos biológicos, como remodelação de tecidos e desenvolvimento de órgãos, regulação de processos inflamatórios e no câncer (WALKER; MOJARES; DEL RÍO HERNÁNDEZ, 2018).

A classificação acontece em forma de subgrupos, sendo as gelatinases, collagenases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs do tipo membrana (MT-MMP) e outras MMPs (tabela 1). Entretanto, os subgrupos diferenciam-se apenas em estruturas aproximadas, pois a especificidade do substrato entre as diferentes MMPs pode se sobrepor (GONZALEZ-AVILA *et al.*, 2019).

São categorizadas de acordo com suas características arquitetônicas, por possuírem três domínios comuns a todas as MMPs, o pré-peptídico que direciona as enzimas para via secretora, o N-terminal pró-peptídico, o domínio catalítico e o domínio C-terminal do tipo hemopexina, o qual está ligado ao domínio catalítico por uma região de dobradiça flexível, que irá determinar a especificidade do substrato. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 contêm um domínio extra de fibronectina que serve como modelador do reconhecimento de colágeno do tipo I e IV, além da capacidade de se ligar a laminina (figura 2) (KESSENBRICK; PLAKS; WERB, 2010).

Tabela 1. Classificação das MMPs e seus substratos

Classificação	Metaloproteinases (MMPs)	Substratos
Colagenases	MMP- 1, 8, 13 e 18	Colágenos tipos I, II e III, VI, IX, X; agrecan; laminina; macroglobulina-2; proteoglicanos
Gelatinases	MMP- 2 e 9	Fragmentos já degradados por colagenases; colágeno tipo IV, I, II, III, V, VII X; elastina; fibronectina, fibrilina; osteoctina; agrecan
Estromelisinases	MMP - 3, 10, 11 e 12	Proteoglicanos; elastina; agrecan; perlecan; fibronectina; laminina e colágenos III e IV
Matrilisinases	MMP - 7 e 26	Elastina; fibrinogênio; fibronectina; laminina; osteoctina; versican; colágeno tipo IV
MMPs tipo membrana	MT- MMP - 14, 15, 16, 17, 24 e 25	Colágenos tipo I, II e III, fibronectina; gelatinas; laminina; vitronectina; vitronectina; perlecan; proteoglicanos e ativação de outras MMPs
Outras	MMP - 20, 21, 23, 27 e 28	Gelatinas; agreguina; casepina e colágeno IV

*MMP: metaloproteinases da matriz. Fonte: Adaptado de (Gonzalez-Avila et al, 2019).

Figura 2. Estrutura e domínio das MMPs

Legenda: **A:** Domínios comuns a todas as MMPs. **B:** Domínio extra de fibronectina das gelatinases. Fonte: Adaptado de (HUANG, 2018). Criado em BioRender.com

A maioria das MMPs é secretada como pró-enzimas (zimogênio) que precisam de ativação extracelular. Com exceção das MT-MMP que são ativadas intracelularmente para serem expressas na superfície celular (CUI; HU; KHALIL, 2017). Em um primeiro momento, a forma enzimática das MMPs é expressa inativamente como pró-enzima, devido à interação de um resíduo de cisteína em um domínio pró-peptídico com o íon de zinco (Zn^{+}) presente no domínio catalítico (MOTT; WERB, 2004).

Através de um mecanismo chamado de interruptor de cisteína, onde normalmente é feita a remoção proteolítica do pró-domínio ou uma modificação química da cisteína, as MMPs se tornam proteoliticamente ativas. Para que a clivagem proteolítica do pró-domínio ocorra, é necessária a ação de conversases, as quais, dependendo da sequência, podem ocorrer

intracelularmente pela ação da furina ou extracelularmente por outras MMPs ou serina proteinases como a plasmina (CUI; HU; KHALIL, 2017).

Devido à capacidade de degradação da MEC pelas MMPs, a sua atividade proteolítica deve ser altamente regulada para que não ocorra liberação exacerbada das proteinases através das células do estroma e células inflamatórias, evitando danos teciduais e perpetuação da reposta inflamatória como em doenças crônicas e câncer (LIU; KHALIL, 2017).

Um mecanismo importante na regulação da atividade das MMPs ocorre através de seus inibidores endógenos específicos, os TIMPs, os quais podem apresentar atividades inibitórias sobrepostas em relação às MMPs. Atualmente foram descritos quatro genes da família dos TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (SZARVAS *et al.*, 2011).

Os TIMPs são proteínas pequenas com peso molecular aproximado de 21kD que apresentam diferentes perfis estruturais, propriedades bioquímicas e padrões de expressão (SAKATA *et al.*, 2000). São compostos por três domínios, sendo um N-terminal contendo 125 aminoácidos ligados a um oligossacarídeo, chamado de *Tree-loop* que corresponde a 2/3 de toda molécula, um domínio C-terminal possuindo 95 aminoácidos, sendo estabilizado por três ligações dissulfeto (LIU; KHALIL, 2017).

Embora sempre associados com a função inibitória das MMPs, esta não é sua única função. Essas proteínas também exercem funções biológicas independentes, como regulação da proliferação celular, apoptose, angiogênese, tumorigênese e metástase. A promoção ou inibição desses eventos depende do tipo de célula, da molécula TIMP e de sua concentração (GONZALEZ-AVILA *et al.*, 2019).

A interação entre as metaloproteinases e seus inibidores teciduais é necessária para a fisiopatologia de eventos que envolvam a MEC. Um desequilíbrio entre as MMPs e os TIMPs implica em diversas condições patológicas por meio de diversos mecanismos como destruição tecidual, fibrose e alterações na composição da MEC (LIU; KHALIL, 2017).

2.7 MMP-9 e seu inibidor tecidual TIMP-1 no câncer

É sabido que as MMPs e os TIMPs ocupam papel fundamental em processos fisiológicos como cicatrização e angiogênese, onde um balanço entre ambos é necessário para a homeostase tecidual (SEVIC *et al.*, 2019). A degradação da MEC em torno das células tumorais é uma etapa essencial no câncer, pois facilita a invasão de tumores no tecido conjuntivo e vasos circundantes (WAJNER *et al.*, 2014).

Nos estágios iniciais de lesões neoplásicas, são as interações epitélio-estroma que são primeiramente perturbadas, sendo as MMPs mediadoras desse processo, podendo estar presentes desde etapas iniciais até o estágio mais tardio do desenvolvimento neoplásico (GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2011; SEVIC *et al.*, 2019).

A indução da atividade das MMPs no TME serve como pré-requisito para o crescimento invasivo do tumor, uma vez que é necessária para as características de intravasamento e extravasamento de células neoplásicas, durante a progressão tumoral (SZARVAS *et al.*, 2011). Logo, uma superexpressão dessas proteases foi relacionada com a invasividade tumoral, processos angiogênicos e metástases (QUINTERO-FABIÁN *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, a MMP-9 tem sido alvo de estudos relacionados à invasão tumoral ao estroma e desenvolvimento metastático, sendo identificada de forma isolada em tumores agressivos com pior prognóstico (CONLON; MURRAY, 2019). O TIMP-1 é responsável pela regulação desta protease de forma direta, por isso, quando associada ao seu inibidor tecidual, pode apresentar valor prognóstico (MONDAL *et al.*, 2020).

O TIMP-1 foi o primeiro inibidor de proteinases descoberto sendo responsável diretamente pela inibição de MMP-9 e, portanto, um desequilíbrio entre a MMP-9 e o TIMP-1 pode desempenhar importante papel na progressão do CPT (SAKATA *et al.*, 2000; MONDAL *et al.*, 2020).

Além de digerir prontamente o colágeno da MB e moléculas da MEC, a MMP-9 também está envolvida na participação do aumento da biodisponibilidade de fatores pró-angiogênicos, como na liberação e ativação de fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (DUDA *et al.*, 2020).

2.8 Participação do VEGF no desenvolvimento metastático

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) mediam interações funcionais com células endoteliais constituintes dos vasos sanguíneos (BECs), células endoteliais linfáticas (LECs) e outras células derivadas da medula óssea (BMDCs) que promovem angiogênese, linfangiogênese e, por conseguinte, a metástase (BALAMURUGAN, 2016) .

Células-tronco tumorais e células tumorais ativam uma variedade de mecanismos adaptativos de neovascularização, incluindo angiogênese, vasculogênese, vaso cooptação, intussuscepção e mimetismo vascular por sintetizarem VEGFs (COLWELL *et al.*, 2017). Além de angiogênicos, são considerados importantes agentes mitogênicos, sendo capazes de induzir proliferação celular e aumentar a permeabilidade vascular, que levará a modificação da MEC (BALAMURUGAN, 2016).

Os VEGFs consistem em cinco moléculas (VEGF A - D, bem como o PlGF –fator de crescimento da placenta), na qual a sinalização intracelular pode ser iniciada pela ligação a duas classes de receptores transmembranares: (1) os receptores de tirosina quinase de VEGF (receptores de VEGF 1 a 3) e (2) as neuropilinas (NRP1 e 2). Além disso, diferentes isoformas de Rho GTPases como RhoA, RhoC e RhoG, expressas por células tumorais e endoteliais, regulam a expressão de VEGFs e, por conseguinte, angiogênese (figura 3) (EL BABA *et al.*, 2020)

Figura 3. Participação das moléculas de VEGF nos processos tumorigênicos.

Legenda: As diferentes moléculas de VEGF participam da regulação da tumorigênese, auxiliando na regulação de diversos processos como angiogênese, proliferação, migração e invasão. Fonte: (EL BABA *et al.*, 2020)

Os processos de neoangiogênese e linfangiogênese possibilitam a malignidade tumoral, e, portanto, o VEGF no CPT se determina como um fator prognóstico negativo, juntamente com outros fatores pró-tumorigênicos ao evidenciarem tumores de maior diâmetro, extensão das margens tumorais e extratireoidiana, profundidade de infiltração tumoral, metástases distantes e em linfonodos (CERIC *et al.*, 2020; PANG *et al.*, 2018).

Como já apresentado, além de digerir prontamente o colágeno da MB e elementos da MEC, a MMP-9 também está envolvida na participação do aumento da biodisponibilidade de fatores pró-angiogênicos, como na liberação e ativação de VEGF (DUDA *et al.*, 2020). A MMP-9 auxilia nesse processo induzindo na migração de pericitos, no qual são necessários para a estabilização dos vasos sanguíneos (CONLON; MURRAY, 2019).

A expressão de VEGF e MMP-9 é maior em CPT com metástases em linfonodos quando comparada a tumores não metastáticos, e o mesmo se determina no carcinoma folicular tireoidiano mal diferenciado em relação ao bem diferenciado, ao contrário de TIMP-1 que apresenta correlação negativa com a diferenciação de células tumorais. Deste modo, VEGF, MMP-9 e TIMP-1 apresentam significância clínica na avaliação do grau de diferenciação, invasividade, potencial metastático e prognóstico do carcinoma papilífero da tireoide e carcinoma folicular da tireoide (WANG *et al.*, 2009).

Já uma pesquisa desenvolvida por pacientes com câncer de cólon, analisaram que os níveis de VEGF e TIMP-1 correlacionam positivamente com o surgimento de metástase linfonodal e metástase hepática. Após ressecção hepática, os níveis de VEGF e TIMP-1 permaneceram elevados, determinando-os como fatores preditivos ao mau prognóstico (MIN *et al.*, 2012).

VEGF está relacionado ao crescimento tumoral do CPT como já descrito, enquanto VEGF-C e VEGF-D estão intimamente relacionados à metástase de linfonodo do CPT, visto que mais estudos poderão determinar estes fatores como resposta preditiva à metástase linfonodal (JIANG *et al.*, 2005). Outros estudos também apontam VEGF e IL-23 séricos como potenciais preditores de HT, no entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos associados (ABBASALIZAD FARHANGI; TAJMIRI, 2018).

2.9 MMP-9 no desenvolvimento metastático

A principal causa de mortalidade por câncer está relacionada ao estágio final da doença, denominada de metástase. Este evento é considerado o mais crítico do processo de tumorigênese, o qual compreende a disseminação de células tumorais da lesão primária para tecidos subjacentes ou órgãos distantes através de vias hematogênicas e/ou linfáticas (SHUMAN MOSS; JENSEN-TAUBMAN; STETLER-STEVENSON, 2012).

A relação entre as células tumorais e a MB é considerada como evento crítico para invasão tumoral e para os sinais que iniciam a cascata metastática (MONDAL *et al.*, 2020). A MB normalmente não possui poros que permitem a

migração de células tumorais para que as células evadam do tumor primário, uma diminuição do contato célula-célula e célula-matriz é necessária, bem como a aquisição da capacidade migrar e invadir o estroma adjacente (SCHEAU *et al.*, 2019).

Em tumores malignos de origem epitelial, para que um fenótipo invasivo seja alcançado, as células neoplásicas ativam um programa típico do desenvolvimento embrionário, denominado de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (YE; WEINBERG, 2015). Esse programa consiste na mudança fenotípica epitelial para mesenquimal, tendo como resultado perda ou redução da expressão de marcadores epiteliais, favorecendo aumento de marcadores de células mesenquimais (HOREJS, 2016). Essa conformação de epitelial para mesenquimal apresenta características específicas. O fenômeno EMT é silenciado em tecidos adultos saudáveis, mas pode ser reativado sob condições patológicas como inflamações crônicas, fibrose pós-reparo e câncer (SCHEAU *et al.*, 2019).

As células epiteliais de tecidos normais possuem suas junções aderentes à E-caderina, mantidas em conjunto com anéis de catenina e actina. As junções de oclusão estão associadas ao complexo de polaridade apical, ao passo que a integrina interage com os componentes da MB (SCHEAU *et al.*, 2019). Durante a EMT ocorre a perda da adesão célula-célula, onde indutores (fatores de transcrição) bloqueiam a transcrição de genes que codificam componentes de junções de aderência e oclusão, ocasionando a perda da polaridade celular, tendo como principal alvo a degradação da E-caderina (SCHEAU *et al.*, 2019; YE; WEINBERG, 2015).

O sucesso da disseminação metastática pelo processo EMT é devido à destruição das características adesivas das células por clivagem de componentes da membrana basal e degradação da MEC através da modulação da atividade de MMPs (figura 4) (QUINTERO-FABIÁN *et al.*, 2019).

A MMP-9 é uma das proteases estudadas no processo de EMT, sua participação está em degradar a MB fazendo com que as células percam sua polaridade, além de favorecer a angiogênese tumoral (DUDA *et al.*, 2020). Na superfície celular, a clivagem proteolítica do domínio extracelular da E-caderina

por MMP-9 também prejudica a adesão celular epitelial, sendo capaz de promover a indução do processo EMT (PESTA *et al.*, 2007; SHUMAN MOSS; JENSEN-TAUBMAN; STETLER-STEVENSON, 2012).

Figura 4. Participação da MMP-9 no câncer.

Legenda: Degradação dos constituintes da MEC e MB por ação da MMP-9, que contribui para EMT através da perda da polaridade celular. Fonte: Elaboração própria. Criado em BioRender.com

3. JUSTIFICATIVA

Sabemos que a degradação da MEC por ação das MMPs é parte fundamental tanto no processo inicial quanto na progressão da tumorigênese. Em diversas patologias observamos um desequilíbrio entre as proteases e seus inibidores teciduais, resultando em uma incapacidade dos TIMPs em inibir a atividade das MMPs, causando o aumento exacerbado de sua expressão, favorecendo a progressão tumoral. O CPT é um tumor bem diferenciado que corresponde à grande maioria dos casos de tumores da tireoide. Novos estudos devem ser realizados para que a elucidação da participação das MMPs nesse tipo de tumor seja inteiramente compreendida. Além disso, a MMP-9 tem sido correlacionada com o aumento da expressão de VEGF, sendo este um importante fator angiogênico e mitogênico presente no microambiente tumoral. Compreender a interação entre esses oncogenes pode ser a chave para a compreensão de mecanismos essenciais da tumorigênese.

A caracterização da imunoexpressão dessas proteínas de interesse pode ser útil como futuros marcadores diagnósticos para elucidação dos processos de desenvolvimento e da progressão tumoral. Além disso, a interação dessas proteínas de interesse com os aspectos clínico-patológicos pode nos direcionar quanto a futuros perfis de risco que possam auxiliar no direcionamento da doença.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão imunoistoquímica dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF em lesão primária neoplásica de CPT e em área de metástase linfonodal.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os aspectos clínico-patológicos com os marcadores supracitados.
- Correlacionar o tempo de progressão tumoral com os aspectos clínico-patológicos e com os marcadores de interesse.

5. METODOLOGIA

5.1 Casuística

Este estudo baseia-se em uma análise de casos retrospectivos de CPT tratados cirurgicamente dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- HC-FMRP (USP). Em nosso trabalho, obtivemos a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), uma vez que todos os pacientes submetidos ao processo cirúrgico assinaram previamente o TCLE, permitindo a utilização de dados clínicos e patológicos sob sigilo de sua identidade. O presente estudo foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Experimentação Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), de acordo com o processo HCRP nº 10762/2019 e Parecer Consubstanciado número 3.709.741 (anexo A).

Primeiramente foi realizado um levantamento de casos de pacientes que apresentaram o diagnóstico de CPT no período de 2010 a 2015 totalizando 308 casos em um período de 05 anos e, posteriormente, uma seleção foi realizada de acordo com os critérios de inclusão, que levaram à escolha de 32 casos em meio de 308 casos totais, pois apenas esses 32 seguiam os critérios para inclusão do estudo. Entretanto, 06 pacientes foram excluídos ao decorrer do estudo, devido à perda de material durante o processamento das análises de imunoistoquímica. Durante a análise do laudo anatomo-patológico, observamos que 11 dos 26 pacientes do estudo, apresentaram o diagnóstico de tireoidite de Hashimoto em associação ao CPT.

Selecionamos blocos histológicos de 26 pacientes pertencentes ao estudo que tinham tumores primários de CPT e tumores metastáticos linfonodais. Deste modo, foram selecionados blocos histológicos de tireóide com lesões neoplásicas primárias de CPT e blocos histológicos dos mesmos pacientes com metástases linfonodais, os quais foram subdivididos em dois grupos: o grupo CPT correspondendo ao grupo de lesão primária e o grupo ML correspondendo à lesão de metástase linfonodal (ML) (figura 5). Para o estudo, as lâminas arquivadas coradas por hematoxilina-eosina (HE) foram reavaliadas

pelo patologista responsável para certificar o diagnóstico e selecionar as biópsias com área de lesão mais representativa.

Figura 5. Fluxograma do delineamento amostral.

Fonte: Elaboração própria. Criado em BioRender.com

Como critérios de inclusão deste estudo, foram incluídos:

- Pacientes que apresentaram metástase em linfonodo cervical
- Bloco de parafina contendo ao menos um fragmento com a área representativa de lesão primária e metástase.

Como critérios de exclusão:

- Biópsias com presença de autólise, artefatos ou sinais de processamento inadequado.

Dados demográficos, tais como sexo, idade do diagnóstico, tamanho tumoral, variante histológica, tireoidite de Hashimoto, estadiamento patológico e recorrência foram obtidos através de prontuários médicos do Hospital das Clínicas da FMRP. A classificação de estadiamento foi realizada conforme os critérios TNM definidos pelo *American Joint Committee on Cancer* 7ª edição. E ainda, para posteriores análises, seguimos o mesmo critério de idade de corte (< 45 anos e ≥ 45 anos) proposto pelo mesmo (anexo B).

5.2 Análise Imunoistoquímica

Cortes com espessura de 5µm foram realizados em micrótomo Leica RM 2125 RTS (*Leica Instruments*, Nusslich, Alemanha) em amostras parafinadas, e posteriormente fixadas em lâminas de vidro com carga positiva para serem submetidas à técnica de imunoistoquímica. Para a realização das análises de imunoistoquímica, utilizamos o sistema de detecção livre de biotina kit *Reveal Spring®*, Biogen, Pleasanton, CA, USA.

As lâminas foram mantidas em estufa a 60°C para que o excesso de parafina fosse retirado. Em sequência, realizamos o processamento para desparafinar os tecidos em uma bateria de xilol por cerca de 20 segundos e posteriormente reidratamos em álcool absoluto com concentrações decrescentes por 1 minuto (concentrações de 100% e 95% respectivamente). Ao final deste processo, as lâminas foram lavadas em água corrente.

A reação foi desenvolvida utilizando recuperação antigênica em panela de vapor durante 35 minutos a 95°C, com tampão citrato em pH 6,0. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada a 3% em PBS por 15 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução de bloqueio de proteínas ultra V por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em BSA nas concentrações definidas conforme a tabela a seguir (tabela 2), onde permaneceu *overnight*.

Passado o tempo de ação do anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com solução de complemento por 10 minutos. Em sequência incubamos as lâminas com solução de conjugado HRP por 15

minutos e dado o tempo, realizamos a lavagem com PBS. Como revelador das reações químicas utilizou-se o cromógeno DAB (3,3- diaminobenzidine) com um tempo de ação de 2 minutos.

A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Carazzi por 30 segundos e em seguida realizamos a desidratação dos cortes em soluções de álcool absoluto e xilol para que as lâminas fossem submetidas ao meio de montagem. Para as reações analisadas, utilizamos o controle externo positivo conforme indicação do fabricante. Após realização da técnica, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional (Axiostar Plus, Zeiss, Göttingen, Alemanha).

Tabela 2. Relação de anticorpos utilizados na técnica de imunoistoquímica

Marcador	Tipo	Fabricante	Diluição	Controle Positivo
MMP-9	Monoclonal Coelho	Cusabio (PA 002676)	1/300µl	Placenta
TIMP-1	Policlonal Coelho	Boster (PA 1385)	1/200 µl	Placenta
VEGF	Monoclonal Camundongo	SantaCruz (SC 7269)	1/200 µl	Placenta

Fonte: Elaboração própria

5.3 Análise das células Imunomarcadas por MMP-9, TIMP-1, VEGF

Após a realização da técnica de imunoistoquímica, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional, considerando como positivas o citoplasma de células coradas em marrom. Para observação da intensidade de marcação, atribuímos os seguintes escores: 0 (zero) para ausência de marcação, + (uma cruz) para marcação fraca, ++ (duas cruzes) marcação moderada e +++ (três cruzes) para marcação intensa.

5.4 Análise estatística

As análises foram realizadas com auxílio do software *SAS Statistical Software* (version 9.4.; SAS Institute, Inc. Cary, NC, 2013) e o nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Para verificar as características clínico-patológicas do estudo e os marcadores de interesse nos diferentes grupos, o modelo proposto foi o modelo de regressão logística multinomial ordinal com medidas repetidas. Este modelo permite a associação de variáveis independentes com uma variável reposta, sendo esta do tipo categórica ordinal com mais de dois níveis. Para as comparações entre as características e os marcadores de interesse nos diferentes grupos, utilizamos o teste exato de Fisher e o teste de Qui-quadrado.

Utilizamos a análise de sobrevida para relacionar o tempo de sobrevida (tempo até a progressão) com os aspectos clínico-patológico e os marcadores de interesse. Para isso, foram construídas curvas de Kaplan-Meier e para verificação da existência de diferença entre as curvas, aplicamos o teste de LogRank. O tempo de sobrevida é calculado entre a data de diagnóstico e a data do evento de progressão, resultando no tempo médio para desenvolver uma progressão tumoral.

Também foram calculados Hazard Ratio bruto e ajustado através do modelo de regressão de Cox simples e múltiplo. Um dos objetivos do modelo de regressão ajustado é controlar possíveis efeitos confundidores entre as variáveis presentes no modelo e o desfecho, observando como os marcadores se comportam simultaneamente. Uma variável confundidora é capaz de modificar a relação de uma variável independente de interesse com o desfecho, de forma a tornar essa relação espúria ou, até mesmo, potencializar esse efeito. Em resumo, no modelo de Cox bruto observamos a interação dos marcadores isoladamente e no modelo ajustado observamos como os marcadores se comportam na presença de outros.

6. RESULTADOS

6.1 Análise descritiva dos aspectos clínico-patológicos

Ao analisar a tabela 3 observamos que dos 26 casos de CPT/ML, 76,92% dos pacientes pertencem ao sexo feminino e apenas 23,08% ao sexo masculino. A idade média do diagnóstico foi de 38,12 anos (desvio padrão de 15,10) com mediana de 35 anos. A idade mínima de paciente pertencente ao estudo foi de 13 anos, estando o paciente mais velho com 79 anos. Conforme os critérios de classificação, cerca de 65,38% dos pacientes foram classificados no estágio I, seguido de 23,08% classificados no estágio IV e 11,54% no estágio III.

Durante análise do laudo anatomo-patológico, observamos a ausência do tamanho tumoral de apenas um paciente, deste modo, em nosso estudo analisamos o tamanho tumoral de 25 pacientes. A média do tamanho tumoral foi de 2,88 cm (desvio padrão de 1,83cm) e mediana de 2,30cm, com mínimo de 1,0cm e máximo chegando a 7,50cm.

Todos os 26 pacientes pertencentes a este estudo apresentaram metástase em linfonodos cervicais no momento do diagnóstico, entre estes, cerca de 34,62% evoluíram com segunda recidiva de metástases linfonodais. O tipo histológico de maior predomínio no estudo foi a variante clássica, a qual correspondeu a 57,07% dos casos, seguida pela variante folicular ocupando 23,08%. Em nosso estudo, também observamos a presença da variante oxifílica (11,54%), multifocal (3,85%) e trabecular (3,85%). Devido ao número reduzido de casos para essas variantes, as análises estatísticas posteriores foram realizadas agrupando essas variáveis. Além disso, observamos que 42,31% dos pacientes apresentaram HT em associação ao CPT.

Tabela 3. Descrição das características clínico-patológicas do estudo.

Características	CPT/ML (n=26)
SEXO	
FEMININO	20 (76,92%)
MASCULINO	6 (23,08%)
Total	26 (100%)
ESTÁDIO	
I	17 (65,38%)
III	3 (11,54%)
IV	6 (23,08%)
Total	26 (100%)
RECIDIVA	
NÃO	17 (65,38%)
SIM	9 (34,62%)
Total	26 (100%)
TIPO HISTOLÓGICO	
Clássica	15 (57,07%)
Folicular	6 (23,08%)
Multifocal	1 (3,85%)
Oxifílica	3 (11,54%)
Trabecular	1 (3,85%)
Total	26 (100%)
TIREOIDITE DE HASHIMOTO (HT)	
NÃO	15 (57,69%)
SIM	11 (42,31%)
Total	26 (100%)

Variáveis	Grupo	n	Média	Desvio Padrão	Mediana	1º Quartil	3º Quartil	Mínimo	Máximo
Idade	CPT/ML	26	38,12	15,10	35,00	24,00	51,00	13,00	72,00
TAMANHO TUMORAL	CPT/ML	25	2,88	1,83	2,30	1,60	3,20	1,00	7,50

* CPT: carcinoma papilífero de tireóide; ML: metástase linfonodal. Fonte: Elaboração própria

6.2 Análise imunoistoquímica dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF

A expressão imunoistoquímica dos marcadores de interesse foi realizada em amostras de tireoide com lesão primária de CPT e em suas respectivas áreas de metástases linfonodais.

A marcação por MMP-9 mostrou-se positiva tanto no grupo CPT quanto no grupo ML (figura 6), e foi identificada no citoplasma de células foliculares, onde grande parte apresentou marcação intensa (69,23% e 65,38% respectivamente) conforme a tabela 4.

Entretanto, não encontramos diferença estatística ($p=0,81$), uma vez que a expressão da MMP-9 demonstrou-se semelhante em ambos os grupos. Também não obtivemos nenhuma marcação nula ou leve por este marcador

Tabela 4. Distribuição da expressão imunoistoquímica de MMP-9 nos grupos CPT e ML.

Grupos			
Score	CPT (n=26)	ML (n=26)	Valor p*
MMP-9			
0	0 (0%)	0 (0%)	0,74
+	0 (0%)	0 (0%)	
++	8 (30,77%)	9 (34,62%)	
+++	18 (69,23%)	17 (65,38%)	

*referente ao modelo de regressão multinomial ordinal com medidas repetidas *p <0,05. CPT: carcinoma papilífero de tireoide; ML: metástase linfonodal; 0: Nulo; +: Leve; ++:Moderado; +++:Intenso. Fonte: Elaboração própria.

Figura 6. Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica da MMP-9

Legenda: **A** e **B** marcação positiva da MMP-9 no grupo CPT (200µm e 100µm respectivamente). **C** e **D** marcação positiva da MMP-9 em células metastáticas no grupo ML (200µm e 100µm respectivamente) Fonte: Elaboração própria.

A expressão leve do marcador TIMP-1 foi predominante no grupo CPT correspondendo 46,15% dos casos (tabela 5), seguido pela marcação moderada e intensa que se apresentou igualmente distribuída (26,92%). Em contrapartida no grupo ML a expressão moderada (46,15%) foi predominante, seguida por marcação leve (34,62%) e apenas 19,23% correspondeu à marcação intensa (figura 7). Nenhuma diferença entre os grupos foi observada ($p=94$).

Tabela 5. Distribuição da expressão imunoistoquímica de TIMP-1 nos grupos CPT e ML.

Grupos			
Score	CPT (n=26)	ML (n=26)	Valor p*
<i>TIMP-1</i>			
0	0 (0%)	0 (0%)	0,74
+	12 (46,15%)	9 (34,62%)	
++	7 (26,92%)	12 (46,15%)	
+++	7 (26,92%)	5 (19,23%)	

*referente ao modelo de regressão multinomial ordinal com medidas repetidas *p <0,05. CPT: carcinoma papilífero de tireoide; ML: metástase linfonodal; 0: Nulo; +: Leve; ++:Moderado; +++:Intenso. Fonte: Elaboração própria.

Figura 7. Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica do TIMP-1.

Legenda: A e B marcação positiva de TIMP-1 no grupo CPT (200µm e 100µm respectivamente). C e D marcação positiva de TIMP-1 em células metastáticas no grupo ML (200µm e 100µm respectivamente) Fonte: Elaboração própria.

A expressão leve do marcador VEGF foi predominante no grupo CPT e ML, correspondendo a 53,85% e 50% respectivamente (tabela 6). A marcação moderada (figura 8) foi igualmente expressa nos dois grupos (34,62%), sendo que o grupo ML apresentou predomínio pela marcação intensa em relação ao grupo CPT (15,38%). Não observamos diferenças entre os grupos ($p=0,74$).

Tabela 6. Distribuição da expressão imunoistoquímica de VEGF nos grupos CPT e ML.

Grupo			
Score	CPT (n=26)	ML (n=26)	Valor p*
VEGF			
0	0 (0%)	0 (0%)	0,65
+	14 (53,85%)	13 (50%)	
++	9 (34,62%)	9 (34,62%)	
+++	3 (11,54%)	4 (15,38%)	

*referente ao modelo de regressão multinomial ordinal com medidas repetidas *p <0,05. CPT: carcinoma papilífero de tireoide; ML: metástase linfonodal; 0: Nulo; +: Leve; ++:Moderado; +++:Intenso. Fonte: Elaboração própria.

Figura 8. Fotomicrografias da expressão imunoistoquímica do VEGF.

Legenda: A e B marcação positiva do VEGF no grupo CPT (200µm e 100µm respectivamente). C e D marcação positiva do VEGF em células metastáticas no grupo ML (200µm e 100µm respectivamente) Fonte: Elaboração própria.

6.3 Comparação da expressão dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF com os aspectos clínico-patológicos

Conforme descrito nas tabelas a seguir, analisamos a expressão dos marcadores com os parâmetros clínicos patológicos.

Como mostrado na tabela 7, separando os pacientes por idade de acordo com a classificação do TNM 7ª edição, a expressão intensa da MMP-9 em pacientes < 45 anos foi de 73,33%, sendo de maior predomínio em comparação aos pacientes que apresentam idade ≥ 45 anos (63,64%). A expressão moderada em pacientes com idade ≥ 45 anos correspondeu a 36,36% e 26,67 em pacientes com < 45 anos. O sexo masculino apresentou 100% da expressão intensa, enquanto no sexo feminino a expressão intensa foi de 60%. A expressão moderada de MMP-9 correspondeu a 40% apenas no sexo feminino. No estadiamento I a expressão intensa foi de 70,59%, apresentando maior frequência em relação à marcação intensa no estadiamento III/IV (66,67%). O estadiamento I apresentou marcação moderada em 29,41% e 33,33% no estadiamento III/IV.

A expressão intensa da MMP-9 na variante histológica clássica foi de 71,43% e moderada em 28,57%, já a variante folicular apresentou uma frequência da expressão intensa em 100%. As demais variantes apresentam predomínio pela expressão moderada em relação à intensa (66,67% e 33,33% respectivamente). Observamos diferença estatística em relação a variante folicular e a marcação da expressão por MMP-9 ($p=0,04$).

A expressão intensa da MMP-9 foi frequente tanto em pacientes que apresentaram HT como nos pacientes com ausência de HT (63,64% e 73,33% respectivamente). A marcação moderada foi frequente em pacientes com HT em 36,36%, quando comparado aos pacientes que não apresentaram HT (26,67%).

A expressão intensa da MMP-9 em pacientes que não apresentou recidiva foi de 70,59%, com frequência maior quando comparados aos pacientes que tiveram recidiva (66,67%). A expressão moderada em pacientes com recidiva foi prevalente em 33,33%. Em relação ao tamanho tumoral,

pacientes que apresentaram tumores com diâmetro $\leq 2\text{cm}$ e $> 2\text{cm}$ apresentaram 72,73% e 64,29% de expressão intensa pela MMP-9, respectivamente, e tumores $> 2\text{cm}$ apresentaram frequência pela marcação moderada (35,71%), em comparação aos tumores com diâmetro $\leq 2\text{cm}$. Entretanto, não observamos diferença estatística em relação a expressão da MMP-9 em comparação a recidiva e tamanho tumoral ($p=0,99$).

Resumidamente, sobre a expressão da MMP-9 em relação aspectos clínico-patológicos identificamos diferenças estatísticas apenas em relação às variantes histológicas com a expressão da MMP-9, os demais aspectos clínicos patológicos não apresentaram diferenças estatísticas.

Tabela 7. Comparação entre as características clínico-patológicas em relação ao marcador MMP-9.

Características	Score de imunomarcção da MMP-9				Valor p*
	0	+	++	+++	
FAIXA ETÁRIA					0,68 ^{&}
< 45 anos	-	-	4 (26,67%)	11 (73,33%)	
≥ 45 anos	-	-	4 (36,36%)	7 (63,64%)	
SEXO					0,13 ^{&}
FEMININO	-	-	8 (40%)	12 (60%)	
MASCULINO	-	-	0 (0%)	6 (100%)	
ESTÁDIO					0,99 ^{&}
I	-	-	5 (29,41%)	12 (70,59%)	
III/IV	-	-	3 (33,33%)	6 (66,67%)	
#TIPO HISTOLÓGICO					0,04 [#]
Clássica	-	-	4 (28,57%)	10 (71,43%)	
Folicular	-	-	0 (0%)	6 (100%)	
Outras	-	-	4 (66,67%)	2 (33,33%)	
TIREOIDITE DE HASHIMOTO (HT)					0,68 ^{&}
NÃO	-	-	4 (26,67%)	11 (73,33%)	
SIM	-	-	4 (36,36%)	7 (63,64%)	
RECIDIVA					0,99 ^{&}
NÃO	-	-	5 (29,41%)	12 (70,59%)	
SIM	-	-	3 (33,33%)	6 (66,67%)	
Tamanho Tumoral					0,99 ^{&}
≤ 2 cm	-	-	3 (27,27%)	8 (72,73%)	
> 2 cm	-	-	5 (35,71%)	9 (64,29%)	

#Teste Chi-quadrado. &Teste exato de Fisher. *p <0,05. 0: Nulo; +: Leve; ++: Moderado; +++:Intenso. Fonte: Elaboração própria.

Pacientes com idade < 45 anos apresentaram predomínio da expressão de TIMP-1 leve em 53,33%, seguido pela marcação moderada em 26,67%, com expressão intensa em apenas 20% dos casos (tabela 8). A expressão leve e intensa nos pacientes com idade ≥ 45 anos apresentou-se igualmente distribuída em 36,36% dos casos, apresentando apenas 27,27% de expressão moderada.

O sexo feminino apresentou frequência expressão pela marcação leve do TIMP-1 (50%), seguido por 35% de expressão moderada e apenas 15% de expressão intensa. Em contrapartida, o sexo masculino apresentou predomínio da marcação intensa em 66,67% seguida pela marcação leve em 33,33%, com ausência de marcação moderada. Observamos uma diferença entre a marcação intensa no sexo feminino e masculino, sendo que o sexo feminino expressou apenas 15% da marcação intensa, e o masculino expressou aproximadamente quatro vezes mais a marcação intensa do TIMP-1 (66,67%) ($p=0,04$).

O estadiamento I apresentou maior marcação pela expressão leve em 52,94%, e o estadiamento III/IV apresentou maior expressão da marcação intensa, correspondendo a 44,44% dos casos.

Quanto ao tipo histológico, a variante folicular demonstrou maior expressão da marcação leve em relação à variante clássica (66,67% e 35,71% respectivamente). A marcação leve e intensa na variante clássica apresentou-se igualmente distribuídas (35,71%). O tipo folicular apresentou expressão moderada em 33,33% sendo superior à expressão da variante clássica de 28,57%, além disso, não houve expressão intensa de TIMP-1 na variante folicular.

Pacientes que tiveram HT apresentou expressão leve por TIMP-1 em 45,45% dos casos, com marcação moderada e intensa igualmente distribuída em 27,27%. O mesmo ocorreu em pacientes que não tiveram associação com HT, a expressão moderada e intensa apresentou-se igualmente em 26,67% dos casos, e expressão leve em 46,67%.

Identificamos uma diferença estatística ao analisar pacientes com presença e ausência de recidiva ($p=0,05$). Observamos que nenhum dos pacientes com recidiva expressou marcação intensa pelo marcador TIMP-1, o predomínio foi pela expressão leve em 55,56% e moderada em 44,44%. Em contrapartida, pacientes com ausência de recidiva apresentaram os mesmos valores entre a expressão leve e intensa em 41,18%, com apenas 17,65% de expressão moderada.

A expressão leve de TIMP-1 foi em pacientes com tumor > 2cm sendo prevalente em relação a pacientes com tamanho tumoral $\leq$ 2cm (50% e 45,45% respectivamente). A expressão moderada e intensa desse marcador, esteve semelhante entre tumores com tamanho < 2cm e $\geq$ 2cm, com isso, não identificamos diferença estatística em relação ao marcador de TIMP-1 e ao tamanho tumoral ($p=0,99$).

Tabela 8. Comparação entre as características clínico-patológicas em relação ao marcador TIMP-1.

Características	Score de imunomarcção do TIMP-1				Valor p*
	0	+	++	+++	
FAIXA ETÁRIA					0,70 ^{&}
< 45 anos	-	8 (53,33%)	4 (26,67%)	3 (20%)	
≥ 45 anos	-	4 (36,36%)	3 (27,27%)	4 (36,36%)	
SEXO					0,04*
FEMININO	-	10 (50%)	7 (35%)	3 (15%)	
MASCULINO	-	2 (33,33%)	0 (0%)	4 (66,67%)	
ESTÁDIO					0,44 ^{&}
I	-	9 (52,94%)	5 (29,41%)	3 (17,65%)	
III/IV	-	3 (33,33%)	2 (22,22%)	4 (44,44%)	
TIPO HISTOLÓGICO					0,59 [#]
Clássica	-	5 (35,71%)	4 (28,57%)	5 (35,71%)	
Folicular	-	4 (66,67%)	2 (33,33%)	0 (0%)	
Outras	-	3 (50%)	1 (16,67%)	2 (33,33%)	
TIREOIDITE DE HASHIMOTO (HT)					0,99 ^{&}
NÃO	-	7 (46,67%)	4 (26,67%)	4 (26,67%)	
SIM	-	5 (45,45%)	3 (27,27%)	3 (27,27%)	
RECIDIVA					0,05*
NÃO	-	7 (41,18%)	3 (17,65%)	7 (41,18%)	
SIM	-	5 (55,56%)	4 (44,44%)	0 (0%)	
Tamanho Tumoral					0,99 ^{&}
≤ 2 cm	-	5 (45,45%)	3 (27,27%)	3 (27,27%)	
> 2 cm	-	7 (50%)	3 (21,43%)	4 (28,57%)	

#Teste Chi-quadrado. &Teste exato de Fisher. *p <0,05. 0: Nulo; +: Leve; ++: Moderado; +++:Intenso. Fonte: Elaboração própria.

Como apresentado na tabela 9, pacientes com idade < 45 anos e ≥ 45 anos apresentaram predomínio da expressão leve do VEGF parecidas (53,33% e 54,55% respectivamente). O mesmo ocorreu na marcação moderada, onde pacientes com idade ≥ 45 anos expressaram 36,36% e pacientes com < 45 anos expressaram 33,33%. A expressão intensa do VEGF em pacientes com idade < 45 anos foi de 13,33%.

A expressão leve de VEGF no sexo feminino foi de 60%, sendo frequente em comparação à expressão leve no sexo masculino (33,33%). Em contrapartida, a expressão moderada foi prevalente no sexo masculino em 66,67% em relação a 25% do sexo feminino. O sexo feminino apresentou 15% de marcação intensa, já o sexo masculino não apresentou marcação intensa por VEGF. O estadiamento I não apresentou expressão leve em 52,94% e moderada em 29,41%, já o estadiamento III/IV a expressão leve e moderada foi maior, correspondendo 55,56% e 44,44%. Apenas o estadiamento I apresentou marcação intensa em 17,65%.

Quanto ao tipo histológico, a variante folicular apresentou expressão leve em 83,33% em relação à variante clássica. A variante clássica apresentou expressão 42,86% tanto na marcação leve como na moderada, com expressão de marcação intensa em 14,29%. A variante folicular apresentou marcação moderada em 16,67% e ausência de marcação intensa.

Observamos uma diferença ao analisar a expressão de marcação leve e intensa em pacientes com associação de HT quando comparados aos pacientes que não apresentaram HT ($p=0,01$). Pacientes com HT apresentaram marcação leve em 81,82% e marcação intensa em 18,18%, com ausência de marcação moderada. Pacientes que não apresentaram HT tiveram marcação leve em 33,33%, moderada em 60% e intensa em apenas 6,67%.

Para este marcador, observamos diferença estatística entre pacientes que apresentaram associação com HT daqueles que não apresentaram em relação à expressão leve e intensa pela marcação do VEGF ($p=0,01$).

A expressão leve pelo VEGF foi a de maior predomínio, tanto em pacientes com presença de recidiva quando naqueles com ausência (55,56% e

52,94%). Dos pacientes com ausência de recidiva, apenas 5,88% expressaram marcação intensa de VEGF. A expressão moderada e intensa foi de 22,22% para pacientes com recidiva. Não observamos diferença estatística entre a expressão de VEGF e pacientes com recidiva ($p= 0,37$). O predomínio pela expressão leve também ocorreu em relação ao tamanho tumoral, quando tumores $\leq 2\text{cm}$ apresentaram 63,64% e tumores $> 2\text{cm}$ expressaram 50% da marcação leve. Não identificamos diferença estatística em relação a este parâmetro e a expressão de VEGF ($p=0,86$).

Tabela 9. Comparação entre as características clínico-patológicas em relação ao marcador VEGF.

Características	Score de imunomarcção do VEGF				Valor p*
	0	+	++	+++	
FAIXA ETÁRIA					0,99 ^{&}
< 45 anos	-	8 (53,33%)	5 (33,33%)	2 (13,33%)	
≥ 45 anos	-	6 (54,55%)	4 (36,36%)	1 (9,09%)	
SEXO					0,24 ^{&}
FEMININO	-	12 (60%)	5 (25%)	3 (15%)	
MASCULINO	-	2 (33,33%)	4 (66,67%)	0 (0%)	
ESTÁDIO					0,61 ^{&}
I	-	9 (52,94%)	5 (29,41%)	3 (17,65%)	
III/IV	-	5 (55,56%)	4 (44,44%)	0 (0%)	
TIPO HISTOLÓGICO					0,59 [#]
Clássica	-	6 (42,86%)	6 (42,86%)	2 (14,29%)	
folicular	-	5 (83,33%)	1 (16,67%)	0 (0%)	
Outras	-	3 (50%)	2 (33,33%)	1 (16,67%)	
TIREOIDITE DE HASHIMOTO (HT)					<0,01*
NÃO	-	5 (33,33%)	9 (60%)	1 (6,67%)	
SIM	-	9 (81,82%)	0 (0%)	2 (18,18%)	
RECIDIVA					0,37 ^{&}
NÃO	-	9 (52,94%)	7 (41,18%)	1 (5,88%)	
SIM	-	5 (55,56%)	2 (22,22%)	2 (22,22%)	
Tamanho Tumoral					0,86 ^{&}
≤2 cm	-	7 (63,64%)	3 (27,27%)	1 (9,09%)	
> 2 cm	-	7 (50%)	5 (35,71%)	2 (14,29%)	

#Teste Chi-quadrado. &Teste exato de Fisher. *p <0,05. 0: Nulo; +: Leve; ++: Moderado; +++:Intenso. Fonte: Elaboração própria.

6.4 Análise da relação entre a progressão com os aspectos clínico-patológicos e os marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF.

Utilizamos da análise de sobrevivência para relacionar o tempo até uma segunda progressão metastática e correlacionamos com os parâmetros clínico-patológicos. Para isso, curvas de Kaplan-Meier foram construídas (figuras 9 e 10) e para verificar diferença entre as curvas, utilizamos o teste de Log-Rank (tabela 10 e 11).

Figura 9. Construção de curvas Kaplan-Meier para parâmetros clínico-patológicos

Legenda: A: Geral. B: Faixa Etária. C: Sexo. D: Estadiamento. (HR): Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confiança. *p=0,05. Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 . Construção de curvas de Klaplan-Meier para parâmetros clínico-patológicos.

Legenda: **E:** Variante. **F:** Tireoidite de Hashimoto. (HR): Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confiança. *p=0,05. Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao Log-Rank e os parâmetros clínico- patológicos (tabela 10) não encontramos diferenças estatísticas significativas entre as curvas de Kaplan-Meier (figuras 9 e 10). Observamos que em nosso estudo, os pacientes apresentaram tempo médio para o surgimento de progressão em 5,92 anos. Pacientes com faixa etária < 45 anos, sexo masculino, estadiamento I, variante clássica e com a presença de HT, apresentaram tempo médio para desenvolvimento de uma progressão tumoral menor (3,81; 2,54; 5,68; 3,48 e 1,89 anos respectivamente) em relação aos pacientes com idade ≤ 45 anos, sexo feminino, estadiamento III/IV, ausência de HT e variante folicular. E ainda, o Hazard Ratio (HR), estimado através do modelo de Cox bruto, demonstrou que o sexo masculino (HR:1,16), idade < 45 anos (HR:1,58), variante clássica (HR:4,06) estimou risco maior de desenvolver uma progressão tumoral.

Também observamos que variante folicular apresentou risco de 4,06 vezes mais de desenvolver progressão tumoral em relação à variante clássica. Enquanto a presença de HT apresenta um risco menor de progressão (HR=0,74) (tabela 11).

Tabela 10. Associação da análise de sobrevida com os parâmetros clínico-patológicos.

	Sobrevida	Ponto estimado (anos)	IC 95%	Valor p*
Geral	Média	5,92	4,92; 6,91	
	Total de progressões (n/N)	9/26		
Faixa Etária				0,83
	< 45 anos			
	Média	3,81	3,07; 4,55	
	Total de progressões (n/N)	5/15		
	≥ 45 anos			
	Média	6,28	4,74; 7,82	
Sexo	Total de progressões (n/N)	4/11		0,58
	Feminino			
	Média	6,04	4,92; 7,17	
	Total de progressões (n/N)	7/20		
	Masculino			
Estadiamento	Média	2,54	2,20; 2,87	0,96
	I			
	Média	5,68	4,49; 6,87	
	Total de progressões (n/N)	6/17		
	III/IV			
Variante	Média	6,09	4,10; 8,08	0,34
	Total de progressões (n/N)	3/9		
	Clássica			
	Média	3,49	2,65; 4,33	
	Total de progressões (n/N)	6/14		
TIREOIDITE DE HASHIMOTO (HT)	Folicular			0,67
	Média	6,54	4,28; 8,79	
	Total de progressões (n/N)	2/6		
	Outras			
	Média	7,08	NA	
	Total de progressões (n/N)	1/6		
TIREOIDITE DE HASHIMOTO (HT)				0,67
	Não			
	Média	5,99	4,75; 7,23	
	Total de progressões (n/N)	6/15		
	Sim			
	Média	1,89	1,55; 2,23	
	Total de progressões (n/N)	3/11		

Teste de Log-Rank. IC: Intervalo de Confiança. *p<0,05. Fonte: Elaboração própria

Tabela 11. Modelo de Cox bruto associado os parâmetros clínico patológicos.

Modelo de regressão de Cox bruto			
Comparações	Hazard Ratio (HR)	IC 95%	Valor p
Faixa Etária (até 40 vs 40 ou mais)	1,16	0,29; 4,57	0,83
Sexo (MASC vs FEM)	1,58	0,30; 8,26	0,58
Estadiamento (III/IV vs I)	1,04	0,26; 4,17	0,96
Variante (clássica vs outras)	4,06	0,49; 34,05	0,20
Variante (folicular vs outras)	2,27	0,21; 25,2	0,50
Variante (clássica vs folicular)	1,79	0,36; 8,93	0,48
HT (sim vs não)	0,74	0,18; 2,96	0,67

IC: Intervalo de Confiança. *p <0,05. Elaboração própria

Também foram construídas curvas de Kaplan-Meier para relacionar o tempo até uma segunda progressão metastática com marcadores MMP-9 TIMP-1 e VEGF (figuras 11 e 12).

Figura 11. Construção de curvas de Kaplan-Meier para MMP-9 e TIMP-1 no grupo CPT e no grupo ML.

Legenda: A: MMP-9 grupo CPT. B: MMP-9 grupo ML. C: TIMP-1 grupo CPT. D: TIMP-1 grupo ML (HR): Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confiança. *p=0,05. Fonte: Elaboração própria

Figura 12. Construção de curvas de Kaplan-Meier para VEGF no grupo CPT e no grupo ML.

Legenda: E: VEGF grupo CPT. F: VEGF grupo ML. (HR): Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confiança. *p=0,05. Fonte: Elaboração própria

Na análise da sobrevida (progressão) com os marcadores de interesse observamos diferença entre as curvas de Kaplan-Meier apenas em relação à expressão da MMP-9 no grupo ML (figura 11 B) que foram identificadas no teste de Log-Rank posteriormente (tabela 12). Pacientes com expressão moderada apresentaram tempo médio menor de 4,31 anos para o desenvolvimento de progressão tumoral, em relação aos pacientes com expressão intensa no grupo ML, que apresentaram tempo médio de 6,8 anos ($p=0,02$). Além disso, pacientes com expressão moderada tiveram $HR=4,65$ vezes o risco de desenvolver a progressão tumoral em relação aos pacientes com expressão intensa (tabela 13)

O marcador TIMP-1 com marcação leve no grupo CPT demonstrou ter um tempo médio de 3,73 anos (IC 95%; 2,98 - 4,48), seguido por um tempo de progressão maior relacionado com a expressão moderada de 5,51 anos (IC 95%; 3,11- 7,90). A expressão moderada de TIMP-1 apresentou um risco de $HR=1,21$ vezes de desenvolver progressão em relação à expressão leve no grupo CPT. Nenhum dos pacientes com expressão intensa por TIMP-1 no

grupo CPT e no grupo ML apresentou recidivas e, por isso, o TIMP-1 não apresentou tempo médio de progressão relacionado à marcação intensa em ambos os grupos. O TIMP-1 no grupo ML demonstrou valores próximos de tempo médio entre as marcações leve e moderada, sendo 4,71 anos (IC 95%; 2,61- 6,28) e 4,16 anos (IC 95%; 3,54 - 4,77) respectivamente. A expressão moderada do TIMP-1 no grupo ML apresentou menor risco (HR:0,43) de desenvolver progressão em relação a marcação leve (HR:0,28)

O VEGF no grupo CPT apresentou tempo médio menor em marcações moderadas, correspondendo a 1,98 anos (IC 95%; 1,92- 2,04) e maior tempo médio de 6,01 anos (IC 95%; 4,66 - 7,36) em marcação leve. Para expressão intensa, o grupo apresentou tempo médio de 4,87 anos (IC 95%; 0,00 - 9,87), com risco maior em HR=2,67 (IC 95%;0,49 - 14,64) e HR=2,93 (IC 95%;0,39 - 21,83) vezes de desenvolver progressão em comparação à expressão leve e moderada respectivamente.

Em contrapartida, o grupo ML demonstrou maior tempo médio de 7,08 anos em marcação intensa, entretanto, o maior número de progressões está relacionado com a marcação de intensidade leve, onde o tempo médio de progressão foi de 5,82 anos (IC 95%; 4,31 - 7,33). Pacientes com expressão moderada apresentaram o risco maior em HR=1,34 vezes em relação aos pacientes com expressão leve (IC 95%; 0,28- 6,44)

Tabela 12. Análise da sobrevida de acordo com a imunomarcacão de MMP-9, TIMP-1 e VEGF.

Sobrevida	Ponto estimado (anos)	IC 95%	Valor p*
MMP-9 (CPT)			0,75
++			
Média	3,67	2,36; 4,99	
Total de progressões (n/N)	3/8		
+++			
Média	6,12	4,96; 7,28	
Total de progressões (n/N)	6/18		
TIMP-1 (CPT)			0,14
+			
Média	3,73	2,98; 4,48	
Total de progressões (n/N)	5/12		
++			
Média	5,51	3,11; 7,90	
Total de progressões (n/N)	4/7		
VEGF (CPT)			0,44
+			
Média	6,01	4,66; 7,36	
Total de progressões (n/N)	5/14		
++			
Média	1,98	1,92; 2,04	
Total de progressões (n/N)	2/9		
+++			
Média	4,87	0,00; 9,87	
Total de progressões (n/N)	2/3		
MMP-9 (ML)			0,02*
++			
Média	4,31	2,39; 6,22	
Total de progressões (n/N)	6/9		
+++			
Média	6,80	5,79; 7,80	
Total de progressões (n/N)	3/17		
TIMP-1 (ML)			0,09
+			
Média	4,71	2,61; 6,82	
Total de progressões (n/N)	6/9		
++			
Média	4,16	3,54; 4,77	
Total de progressões (n/N)	3/12		
VEGF (ML)			0,44
+			

Média	5,82	4,31; 7,33
Total de progressões (n/N)	5/13	
++		
Média	2,35	1,79; 2,91
Total de progressões (n/N)	3/9	
+++		
Média	7,08	NA
Total de progressões (n/N)	1/4	

Teste de LogRank. IC: Intervalo de Confiança. *p<0,05. Fonte: Elaboração própria

Tabela 13: Modelo de Cox bruto associado aos marcadores

	Modelo de regressão de Cox bruto			
	Comparações	Hazard Ratio (HR)	IC 95%	Valor p
CPT	MMP-9 (++) vs (+++)	1,25	0,31; 5,03	0,75
	TIMP-1 (++) vs (+)	1,21	0,31; 4,63	0,79
	VEGF (++++) vs (+)	2,67	0,49; 14,64	0,26
	VEGF (++) vs (+)	0,91	0,16; 5,14	0,92
	VEGF (++++) vs (++)	2,93	0,39; 21,83	0,30
ML	MMP-9 (++) vs (+++)	4,65	1,15; 18,73	0,03
	TIMP-1 (++) vs (+)	0,43	0,10; 1,95	0,28
	VEGF (++++) vs (+)	0,74	0,08; 6,63	0,79
	VEGF (++) vs (+)	1,34	0,28; 6,44	0,71
	VEGF (++++) vs (++)	0,55	0,06; 5,42	0,61
IC: Intervalo de Confiança. *p <0,05. Elaboração própria				

Os resultados a seguir levam em consideração o ajuste simultâneo pelos marcadores, MMP-9, TIMP-1 e VEGF. O modelo de regressão de Cox ajustado (tabela 15) também estima o Hazard Ratio (HT), no qual todas as variáveis são inseridas juntas a fim de controlar possíveis efeitos confundidores.

A marcação moderada da MMP-9 no grupo ML apresentou HR= 3,06, demonstrando maior risco de progressão em relação à marcação intensa (IC 95%; 0,423- 21,89). Entretanto, a MMP-9 perde sua significância em relação ao modelo bruto quando inserida com outros marcadores no grupo ML. No grupo CPT, a marcação moderada por MMP-9 exibiu HR = 0,98 em relação à marcação intensa (IC 95%; 0,16- 5,82; p=0,98).

Expressão moderada do TIMP-1 no grupo CPT e grupo ML apresentou riscos semelhantes de desenvolver progressão tumoral em relação à

expressão leve, obtendo valores de HR próximos entre os grupos. A comparação da expressão intensa do TIMP-1 não foi realizada no modelo de Cox ajustado, pelo mesmo motivo do modelo de Cox bruto, que é devido à ausência do evento (progressão), não sendo possível estimar o Hazard Ratio.

A marcação intensa do VEGF no grupo CPT obteve HR=1,93 vezes o risco de progressão quando comparado à marcação leve, sendo maior neste grupo quando comparado ao grupo ML que apresentou HR=0,74, representando menor risco de progressão para a expressão intensa em relação à expressão leve. Expressão moderada no grupo CPT e ML apresentaram 1,03 (IC 95%; 0,18- 5,80) e 1,46 (IC 95%; 0,31- 6,99) vezes o risco de progressão, respectivamente, sob marcação leve. No grupo CPT marcação intensa apresentou HR=1,87 (IC 95%; 0,18- 19,64) para progressão em relação à moderada e no grupo ML foi de HR=0,50 (IC 95%; 0,04- 5,78), demonstrando menor risco de progressão (p=0,58).

Tabela 14. Modelo associado à análise de sobrevida: Cox ajustado

Modelo de regressão de Cox ajustado pelos marcadores em CPT				
	Comparações	Hazard Ratio (HR)	IC 95%	Valor p
CPT	MMP-9 (++ vs +++)	0,98	0,16 ; 5,82	0,98
	TIMP-1 (++ vs +)	0,90	0,12 ; 6,84	0,92
	VEGF (+++ vs +)	1,93	0,23 ; 16,14	0,54
	VEGF (++ vs +)	1,03	0,18 ; 5,80	0,97
	VEGF (+++ vs ++)	1,87	0,18 ; 19,64	0,60
Modelo de regressão de Cox ajustado pelos marcadores em ML				
	Comparações	Hazard Ratio (HR)	IC 95%	Valor p
ML	MMP-9 (++ vs +++)	3,06	0,423 ; 21,89	0,27
	TIMP-1 (++ vs +)	0,93	0,12 ; 7,45	0,95
	VEGF (+++ vs +)	0,74	0,08 ; 6,96	0,79
	VEGF (++ vs +)	1,46	0,31 ; 6,99	0,63
	VEGF (+++ vs ++)	0,50	0,04 ; 5,78	0,58

*HR: Hazard Ratio; IC: Intervalo de Confiança. *p<0,05. Fonte: Elaboração própria

7. DISCUSSÃO

Pesquisas realizadas pelo *Globocan*, uma agência internacional de pesquisa sobre o câncer, estimam a incidência e mortalidade por câncer, afirmando que no ano de 2020 houve cerca de 19,3 milhões de casos novos diagnosticados e 10 milhões de mortes por câncer no mundo. Os CTs ocuparam o lugar de 9º de neoplasia mais incidente em ambos os sexos no mesmo ano (SUNG et al., 2021).

Em nosso estudo observamos que o sexo feminino foi o de maior incidência em 76,92% dos casos de CPT, e apenas 23,8% correspondeu ao sexo masculino. O aumento da incidência de tumores da tireoide em mulheres já foi observado por outros autores como Jegerlehner *et al* (2017) e Kweon *et al* (2013), entretanto, a explicação para essa diferença na incidência ainda é alvo de discussões (JEGERLEHNER et al., 2017; KWEON et al., 2013).

O estrogênio é um dos principais hormônios sexuais femininos que poderia explicar a diferença em relação à incidência no sexo feminino. Os CTs são frequentes com o início da puberdade em meninas e também durante a gravidez devido aos níveis elevados de estrogênio nesses períodos (SULLIVAN, 2019). Durante o período da perimenopausa os CTs também são frequentes e diminuem durante o período de pós-menopausa devido à diminuição dos níveis de estrogênio (MYUNG et al., 2017).

O estradiol (E2) corresponde ao estrogênio predominante durante o período reprodutivo e é considerado como um agente estimulador células benignas e malignas da tireoide, atuando por uma via genômica clássica que é mediada por receptores de estrogênio α e β (ER α e ER β), e por outra via não genômica de receptores de estrogênio associado à membrana (MYUNG et al., 2017).

A expressão imunoistoquímica de receptores de estrogênio (ERs) foi observada em tecido de tireoide normal, doenças benignas da tireoide e carcinomas diferenciados e indiferenciados (ANGELL; ALEXANDER, 2019). A expressão elevada de ER α é capaz de aumentar a proliferação celular quanto maior for expressão de ER β , o que pode aumentar a diferenciação e induzir a apoptose. Nos CTs, E2 estimula o crescimento e amplifica seu efeito de

promoção de crescimento por suprarregulação de ER α (DERWAHL; NICULA, 2014).

O receptor ligado à membrana (mER) e ao E2 em células foliculares estimula as vias de proliferação e sobrevivência celular como a MAPK e PI3K/Akt que são críticas para a regulação do crescimento de tumores. Além disso, essas vias também são estimuladas por mecanismos envolvendo o gene *BRAF*^{V600E}, um dos principais genes relacionados ao desenvolvimento de CPT (DERWAHL; NICULA, 2014).

Embora o estrogênio seja um importante fator para o crescimento celular tanto em células benignas quanto malignas da tireoide, com ação mediada principalmente pelo seu receptor ER α , ele pode apresentar padrões de expressão diferentes nos tumores de tireoide, dificultando a identificação do seu papel na patogênese (ANGELL; ALEXANDER, 2019). Com isso, é evidente a necessidade de novos estudos que correlacionem a participação do estrogênio e seus receptores com a incidência de CPT em mulheres.

A idade média dos pacientes do nosso estudo foi de 38,12 anos, estando o paciente mais novo com 13 anos e o mais velho com 79 anos. Como relatado anteriormente, o CPT possui incidência no sexo feminino por estar associado à idade reprodutiva. O predomínio pelo sexo feminino em 76,92% em nosso estudo poderia estar relacionado à média de idade jovem dos pacientes. Entretanto, é necessário realizar novas análises para confirmar tal hipótese.

A presença de fatores clínicos como idade avançada, presença de metástase linfonodal e/ou à distância e ainda extensão extratireoidiana, possuem valor prognóstico no CPT e a taxa de mortalidade é maior em pacientes com idade superior à 45 anos (VUONG et al., 2017). No estudo de SHIN *et al* (2020) tumores com diâmetro ≥ 2 cm foram associados à extensão extratireoidiana e apresentou alto valor preditivo para o desenvolvimento de metástase linfonodal e recorrência (SHIN *et al.*, 2020).

No trabalho de Grogan et al (2013) 78% dos pacientes apresentaram doença no estadiamento I (GROGAN et al., 2013). Conforme a classificação

TNM (AJCC 7^o edição), nossos resultados expressaram cerca de 65,38% dos pacientes classificados no estadiamento I. Em estudos como o realizado por Xu *et al* (2018) e Zhang *et al* (2012) o sexo masculino, idade ≥ 45 anos e diâmetro do tumor são fatores de risco para o surgimento de metástase em linfonodo central (XU; XU; WANG, 2018; ZHANG *et al.*, 2015).

Em nosso trabalho obtivemos uma média do tamanho tumoral de 2,88 cm, sendo o de menor diâmetro 1,0 cm e o maior chegando a 7,50cm. Tumores acima de 2,0 cm têm sido correlacionados com o risco de metástase linfonodal, entretanto, de acordo com Krajewska *et al* (2020) e Tran *et al* (2018) o acometimento de linfonodos também pode ocorrer em tumores com diâmetro de $\leq 1,0$ cm denominados de microcarcinomas (KRAJEWSKA *et al.*, 2020; TRAN *et al.*, 2018).

Um considerável fator de risco é a metástase de linfonodo cervical, que reflete em maiores taxas de recorrência e menor taxa de sobrevida (JIN *et al.*, 2018). Pacientes com CPT e metástase linfonodal que obtiveram acompanhamento clínico por 10 anos apresentaram aumento nas taxas de recorrência (LIU *et al.*, 2015). Em nosso estudo, todos os pacientes apresentaram metástase de linfonodo cervical no momento do diagnóstico de CPT e, ainda, cerca de 34,62% apresentaram linfonodos recidivados posteriormente. Em um estudo de coorte realizado na Universidade de Chicago, onde o acompanhamento clínico de casos de CPT ocorreu por 27 anos, foi demonstrado aumento de recidiva em 75 casos novos (28%). E ainda, destes casos de recorrência, 68% ocorreram dentro dos primeiros 10 anos (GROGAN *et al.*, 2013).

Atualmente, a doença autoimune mais comum que acomete a glândula tireoide é a HT, com a incidência em torno de 2% em toda a população, e a coexistência entre HT e CPT ainda é foco de pesquisas e controvérsias. (ZHU *et al.*, 2016). Em nosso estudo, observamos que 42,31% dos pacientes com CPT também apresentaram diagnóstico de HT.

Segundo Zhu *et al* (2016), a HT é frequentemente encontrada em CPT quando comparada a outros tipos de carcinomas e doenças benignas da tireoide e, em seu estudo, 36,6% dos pacientes apresentavam associação de

HT com CPT (ZHU et al., 2016). A coexistência de HT e CPT foi positiva no estudo de Lee *et al* (2013) e Girardi et al (2013) em 23% e 35,4% dos casos respectivamente e com associação ao sexo feminino (GIRARDI; BARRA; ZETTLER, 2013; LEE et al., 2013).

O prognóstico da HT em pacientes com CPT ainda é pauta de discussões no meio científico. A existência concomitante entre ambos tem sido associada a um melhor prognóstico onde os pacientes exibem características clínico-patológicas menos agressivas, como ausência de extensão extratireoidiana, metástases linfonodais. Por se tratar de uma doença autoimune microambiente de HT associado ao CPT, ela possui aumento de células T, como CD4+ e principalmente de T citotóxicos (CD8+) que são capazes de ativar resposta antitumoral, afetando a vigilância imunológica (NOURELDINE; TUFANO, 2015). No estudo de Zhang *et al* (2014) pacientes com HT e CPT coexistentes eram mais jovem, possuíam menor tamanho tumoral com menos metástases de linfonodos ($p < 0,05$) (ZHANG et al., 2014).

A estreita relação entre a inflamação e o câncer já foi proposta há várias décadas a fim de compreender as complexas interações das vias inflamatórias, indução e progressão tumoral (SULAIEVA et al., 2020). A indagação existente é sobre o paradoxo da HT no desenvolvimento e progressão do CPT, através de uma ligação direta e não somente de casualidade entre essas duas doenças prevalentes na tireoide. Investigações detalhadas sobre a coexistência de tais patologias podem auxiliar na identificação de fatores predisponentes (ANTONACI et al., 2009; MAROTTA et al., 2017).

O CPT tem se caracterizado por diversos fatores como idade, sexo, tamanho tumoral, presença ou ausência de metástase (nodal e/ou à distância), além do tipo histológico (JIANG et al., 2018). Diversas variantes histológicas foram descritas para o CPT e algumas associadas ao pior prognóstico, entretanto, nossos conhecimentos sobre o comportamento biológico e prevalência ainda continuam escassos.

Em nosso estudo, a variante histológica de maior predomínio foi a clássica, correspondendo a 57,07% dos casos, seguida pelo padrão folicular (23,08%), representando juntas 80% do total. Nossos dados foram

semelhantes aos dados encontrados no trabalho de Girardi *et al* (2013), no qual 31,07% dos casos de CPT apresentaram padrão clássico e apenas 16% folicular (GIRARDI; BARRA; ZETTLER, 2013).

Acredita-se que clinicamente a variante folicular apresente comportamento semelhante ao padrão clássico de CPT, no entanto, estudos observam menor prevalência de metástase linfonodal associado à variante folicular (LAM; LO; LAM, 2005). Em seu trabalho, Lang *et al* (2006) não observou diferenças entre características clínico patológicas como a idade e sexo dos pacientes em relação à variante clássica e folicular. Entretanto, ao analisar histologicamente, o mesmo afirmou que pacientes com padrão folicular apresentaram menos metástase de linfonodos cervicais do que na variante clássica ($p=0,027$) (LANG *et al.*, 2006).

As células tumorais são amplamente influenciadas por interações físico-químicas entre os diversos constituintes que descrevem a complexibilidade da matriz extracelular. Neste estudo, objetivamos demonstrar a importância da MMP-9, TIMP-1 e VEGF no CPT e suas contribuições para a migração e invasão de células tumorais.

Em nosso estudo, não observamos diferença estatística em relação a expressão dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF nos diferentes grupos de estudo. No trabalho de Zhang *et al* (2003), a expressão intensa da MMP-9 foi de 65,23% em células de carcinoma gástrico primário e a expressão de TIMP-1 de 30,89%. O padrão de expressão MMP-9 foi maior que a expressão de TIMP-1, correlacionou-se à incidência de metástase em linfonodos. Ainda neste estudo, a invasão e metástase de carcinomas gástricos diminuíram significativamente em casos, onde MMP-9 e TIMP-1 apresentaram expressão balanceada (ZHANG *et al.*, 2003).

No estudo de Liu *et al* (2019) a expressão intensa de MMP-9 foi correlacionada com as características invasivas de CPT, sendo maior em pacientes que apresentaram metástase de linfonodo cervical central e de linfonodo lateral, estadiamento III/IV (LIU *et al.*, 2019).

A atividade da MMP-9 está intimamente ligada aos processos de migração e invasão de células tumorais através da degradação da MB devido à digestão do colágeno IV. Devido a isso, a participação dos TIMPs na regulação da atividade das MMPs é fundamental para evitar danos teciduais causados pelo desarranjo da MEC. A alta expressão da MMP-9 associada à diminuição da expressão de TIMP-1 pode ser sugestivo de falha no mecanismo de regulação TIMP- MMP, colaborando para a progressão tumoral.

Entretanto, o papel do TIMP-1 não é restrito apenas as MMP-9, pois possui funções independentes como, por exemplo, auxiliar na atividade mitogênica e também como ativador potenciador de eritróides (EPA), estimulando o crescimento nos precursores eritróides. Alguns estudos correlacionaram a expressão aumentada de TIMP-1 em tumores com pior prognóstico e redução da sobrevida (YLISIRNIÖ et al., 2001).

Em uma de suas publicações, Jackson *et al* (2017), demonstrou que o TIMP-1 estava aumentado em estágios mais avançados de tumores, como de mama e cérebro, por conseguinte, sendo relacionado com o menor tempo de sobrevida (JACKSON et al., 2017). Portanto, o aumento da expressão do TIMP-1 pode ser atribuído em resposta à atividade excessiva das metaloproteinases, mas também, como demonstrado, em resposta independente da protease, determinando-se com funções pró-tumorigênicas.

Além da participação nos processos envolvendo a MEC e MB, a MMP-9 também está sendo envolvida com os processos angiogênicos através da estimulação do VEGF. No trabalho de Yang *et al* (2010), a expressão de VEGF em conjunto com a expressão de MMP-9 foi positiva em 73,2% dos casos de carcinoma gástrico, sendo significativamente maior em relação ao grupo que apresentou expressão negativa para MMP-9, demonstrando uma relação positiva entre expressão de MMP-9 e VEGF (YANG et al., 2010).

Em nosso estudo, tanto grupo CPT quanto no grupo ML, não foi encontrada diferença estatística em relação ao VEGF ($p=0,65$). Diversos fatores presentes no microambiente tumoral podem contribuir para inibição do VEGF, resultando em sua baixa expressão, como por exemplo, o TIMP-1 que pode ser relacionado com atividade antiangiogênica. Embora os TIMPs

participem do processo de manutenção dos vasos, eles também são capazes de diminuir os processos angiogênicos (YANG et al., 2010).

No trabalho de Ikenaka *et al* (2003), a angiogênese em tumor primário transplantado, foi inibida em camundongos transgênicos com superexpressão de TIMP-1 em comparação com os camundongos controle. Em contrapartida, fora demonstrado que o crescimento de células tumorais em camundongos transgênicos foi mais rápido em comparação aos camundongos controle (IKENAKA et al., 2003).

O predomínio da expressão leve do VEGF em nosso estudo pode ser justificado pelos efeitos multifuncionais da proteína TIMP-1, contudo, o funcionamento de TIMP-1 na angiogênese tumoral ainda não foi elucidado.

Para melhor compreensão das interações do CPT, analisamos a expressão positiva dos marcadores, correlacionando-os com os parâmetros clínico-patológicos, com objetivo de auxiliar diagnóstico, prognóstico e tratamentos destes pacientes oncológicos, visto que estes dados podem favorecer investigações futuras de fatores predisponentes.

No trabalho de Meng *et al* (2014) a expressão positiva de MMP-9 e VEGF foi significativamente associada com idade ≥ 45 anos e estadiamento III/IV ($p=0,004$ e $p=0,003$) (MENG *et al.*, 2014). No presente trabalho, pacientes com idade < 45 anos, sexo masculino, pertencentes ao estadiamento I e com ausência de HT, apresentaram frequência da expressão intensa pela MMP-9.

De acordo com o estudo de Lang *et al* (2006) pacientes com padrão folicular apresentavam redução de metástases em linfonodos cervicais (LANG et al., 2006). Em nosso estudo, encontramos diferença estatística ($p=0,04$) quanto ao tipo histológico, pois todos os pacientes com variante folicular apresentaram expressão intensa pela MMP-9, o que pode ter colaborado ao processo metastático. Entretanto, não podemos confirmar tal hipótese devida a todas as nossas amostras terem sido metastáticas.

Nossos dados foram semelhantes ao estudo de Selemetjev *et al* (2016) que, ao correlacionar expressão da MMP-9 com os dados clínico-patológicos, identificou diferença significativa entre o padrão de crescimento clássico e

folicular do CPT. Neste estudo, nenhuma diferença estatística também foi encontrada relacionada ao sexo dos pacientes (ŠELEMETJEV et al., 2016).

Ao analisar o sexo e a expressão o TIMP-1 em nosso estudo, observou-se uma diferença significativa ($p=0,04$), onde o sexo masculino apresentou 66,67% da expressão intensa e 33,33% de expressão leve, com ausência de expressão moderada. Ao contrário de nosso estudo, ILIE et al (2013) descreveu que a expressão positiva de TIMP-1 fora correlacionada com estadiamento I/II e o sexo feminino. O aumento da expressão do TIMP-1 pode estar envolvido no processo de iniciação, progressão e invisibilidade do CPT, uma vez que a mutação do gene $BRAF^{V600E}$ em CPT regula positivamente o aumento da expressão de TIMP-1 através da ativação do sistema NF-KB, resultando no aumento da proliferação celular (ILIE et al., 2013).

O gene $BRAF^{V600E}$ foi descrito como sendo o gene responsável pela iniciação da carcinogênese e na progressão em CPT. O $BRAF^{V600E}$ promove a invasão através da ativação do NF-kB em células de CPT. No estudo de Bommarito et al (2011) foi demonstrado que o gene $BRAF^{V600E}$ causa ativação de NF-kB que, por sua vez, aumenta a expressão de TIMP-1 que irá causar fosforilação de Akt, ativando vias que estão envolvidas com a proliferação e sobrevivência celular (BOMMARITO et al., 2011).

O padrão de expressão do VEGF esteve consideravelmente distribuído entre as características clínico-patológicas. Identificamos diferenças significativas apenas em relação aos pacientes que apresentaram HT em associação ao CPT, pois 81,82% apresentaram expressão leve pelo VEGF ($p<0,01$). No trabalho de Sulaieva et al (2020) observou-se expressão leve e moderada do VEGF em células tumorais de CPT e, quando comparados, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre pacientes com CPT e HT coexistente (SULAIEVA et al., 2020).

O VEGF desempenha papel essencial nos CTs através do aumento da angiogênese e da permeabilidade vascular. Concentrações elevadas do hormônio estimulador da tireoide (TSH) em HT induz a estimulação do VEGF aumentando a vascularização da tireoide (SOH et al., 1996). Níveis elevados de tireoglobulina sérica (TgAb) e anticorpo peroxidase (TPOAb) em pacientes

com HT levam a uma alta expressão de TSH. Em condições patológicas, o TSH tem suas concentrações aumentadas, tornando-se um excelente estimulador do VEGF-A (KAIREMO; KANGASMÄKI; BOM, 2019).

No trabalho de Song *et al* (2019) foi demonstrado que o TSH modulou a angiogênese do microambiente de CPT, aumentando o crescimento do tumor, ativando alternativamente vias PI3K/Akt e ERK, regulando a transcrição de VEGF-A e CXCL8 (SONG *et al.*, 2019).

No trabalho de MA *et al* (2019) a expressão do VEGF-A em tecidos de CPT com HT coexistentes foi maior quando comparado à expressão em tecidos apenas com CPT e tecidos normais. No mesmo estudo, níveis de TPOAb e TgA no soro de pacientes com HT e CPT coexistentes também foram aumentados, demonstrando que a reação autoimune pode promover o crescimento de CPT, através da estimulação do VEGF-A que é um importante fator mitogênico e angiogênico para o desenvolvimento tumoral (MA *et al.*, 2019).

Em relação ao tamanho tumoral, quando comparado os marcadores de interesse, não encontramos evidências de diferenças estatísticas. Entretanto, no estudo de Meng *et al* (2014) a marcação intensa da MMP-9 e do VEGF foi correlacionada com tumores de diâmetro $\geq 2\text{cm}$ (MENG *et al.*, 2014).

Entre os pacientes que apresentaram recidivas, observamos que a expressão intensa da MMP-9 foi frequente em 66,67%, porém, sem evidência estatística ($p=0,99$). Entretanto, uma diferença significativa ($p=0,05$) em relação aos pacientes com recidiva e a expressão do TIMP-1 foi observada, porque 55,56% dos pacientes apresentaram expressão leve, seguida por 44,44% de expressão moderada, com ausência de expressão intensa por este marcador. Ao contrário de nosso estudo, Zhou *et al* (2019) evidenciou em seu estudo que a expressão de MMP-9 em gliomas recorrentes foi significativamente maior em relação a gliomas primários, com redução da expressão de TIMP-1 nos casos de recorrência do tumor (ZHOU *et al.*, 2019).

Como relatado anteriormente, o aumento da expressão de MMP-9 associado à baixa expressão de TIMP-1 é fundamental para o processo de

migração de células tumorais. Em pacientes com recidiva, o predomínio pela expressão intensa da MMP-9 associada ao predomínio da expressão leve do TIMP-1 pode ser sugestivo de um desequilíbrio entre o mecanismo de regulação TIMP-MMP, podendo colaborar positivamente para uma segunda progressão tumoral.

Em longo prazo, o CPT apresenta excelente prognóstico, mas uma parte do número de casos evoluiu com recidiva, com possível evolução para óbito. Frente a isso, utilizamos da análise de sobrevida para relacionar o tempo de uma segunda progressão com aspectos clínico-patológicos e os marcadores de interesse a fim de identificar possíveis perfis de risco. Em nosso estudo, encontramos diferença estatística na análise de sobrevida (progressão) apenas em relação à expressão da MMP-9.

Pacientes que expressaram marcação moderada pela MMP-9 no grupo ML apresentaram tempo médio de progressão menor (4,31 anos) com risco 1,25 vezes maior em comparação aos pacientes com expressão intensa ($p=0,02$). Entretanto, quando inserimos os marcadores juntos no modelo de regressão de Cox ajudada, um efeito confundidor é excluído, desconsiderando o valor P como significativo.

De modo geral, o tempo médio para que ocorresse uma nova progressão em nosso estudo foi de 5,92 anos. Pacientes com idade < 45 anos, sexo masculino, estadiamento I, variante clássica e com associação de HT, foram os que apresentam tempo médio menor de progressão (3,81 anos; 2,54 anos; 5,68 anos; 3,49 anos e 1,89 anos, respectivamente). Pacientes com idade < 45 anos e sexo masculino, estimaram risco em $HR=1,16$ e $HR=1,58$ vezes desenvolver uma progressão em relação a pacientes com idade ≥ 45 anos e sexo feminino.

Ao revisarmos os últimos levantamentos bibliográficos, a originalidade do nosso trabalho se fundamenta por utilizar a análise de sobrevida para avaliar o comportamento da progressão com os parâmetros clínico-patológicos e os marcadores MMP-9, TIMP-1 e VEGF. Analisando a sobrevida do câncer de tireoide em um estudo de coorte, Borges *et al* (2019) demonstraram que o sexo masculino e pacientes com idade < 45 anos exibiam sobrevida em 5 anos menor em 91,5% e 92,8% respectivamente, além disso, pacientes com

metástase a distância apresentaram pior sobrevida em 54,8% (BORGES et al., 2019). Observamos a coerência dos dados do autor com os dados de nosso estudo, porque os pacientes do sexo masculino e com idade < 45 anos exibiram o menor tempo médio para surgimento de recidivas, e, por conseguinte, menor taxa de sobrevida livre de doença.

Embora o resultado da expressão dos marcadores nos diferentes grupos não tenha obtido estatísticas significativas, observamos que a expressão destes marcadores associados aos parâmetros clínico-patológicos podem ser úteis na identificação de perfis de risco para o desenvolvimento de metástase linfonodal e recidiva. No entanto, mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos de interação destes marcadores com o CPT.

8. CONCLUSÃO

Diante ao exposto, observamos que a expressão dos marcadores MMP-9 TIMP-1 e VEGF no CPT não apresentou diferença entre os grupos CPT e ML. Entretanto, encontramos diferenças estatísticas ao confrontarmos os parâmetros clínico-patológicos como tipo histológico, sexo, idade, recidiva e a presença de HT em função aos marcadores de interesse.

A necessidade de novos estudos propõe melhorar a compreensão da participação destes marcadores no CPT, bem como suas interações com aspectos clínico-patológicos a fim de contribuir para identificação de perfis de risco para que se possa aperfeiçoar o monitoramento clínico oncológico e auxiliar no prognóstico dos pacientes.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Possivelmente, o número reduzido de casos pode ter influenciado nos resultados de nossa pesquisa. Como perspectivas futuras desejamos aumentar o número amostral, além da inclusão de um grupo de CPT sem lesão metastática e um grupo controle de tireoide saudável.

Observar a interação dos marcadores de interesse bem como os aspectos patológicos em três grupos diferentes poderá nos fornecer observações grandiosas em relação à progressão tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASALIZAD FARHANGI, M.; TAJMIRI, S. THE CORRELATION BETWEEN INFLAMMATORY AND METABOLIC PARAMETERS WITH THYROID FUNCTION IN PATIENTS WITH HASHIMOTO'S THYROIDITIS: THE POTENTIAL ROLE OF INTERLEUKIN 23 (IL-23) AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) - 1. **Acta Endocrinologica (Bucharest, Romania: 2005)**, v. 14, n. 2, p. 163–168, jun. 2018.

AHN, D. et al. Clinical relationship between Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer. **Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 50, n. 8, p. 1228–1234, nov. 2011.

AKHAVAN, A. et al. Loss of cell-surface laminin anchoring promotes tumor growth and is associated with poor clinical outcomes. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2578–2588, 15 maio 2012.

ANGELL, T. E.; ALEXANDER, E. K. Thyroid Nodules and Thyroid Cancer in the Pregnant Woman. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, Pregnancy and Endocrine Disorders**. v. 48, n. 3, p. 557–567, 1 set. 2019.

ANTONACI, A. et al. Clinical and Biological Relationship Between Chronic Lymphocytic Thyroiditis and Papillary Thyroid Carcinoma. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 17, n. 10, p. 495–503, 1 jan. 2009.

BALAMURUGAN, K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 5, p. 1058–1066, 1 mar. 2016.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 1 dez. 2012a.

BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. Pt 23, p. 5591–5596, 1 dez. 2012b.

BERGDORF, K. et al. Papillary thyroid carcinoma behavior: clues in the tumor microenvironment. **Endocrine-Related Cancer**, v. 26, n. 6, p. 601–614, 1 jun. 2019.

BINNEWIES, M. et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. **Nature Medicine**, v. 24, n. 5, p. 541–550, maio 2018.

BOMMARITO, A. et al. BRAFV600E mutation, TIMP-1 upregulation, and NF-κB activation: closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 18, n. 6, p. 669–685, 1 dez. 2011.

BORGES, A. K. DA M. et al. Differentiated thyroid carcinoma: a 5-years survival study at a referral hospital in Brazil. **Revista De Saude Publica**, v. 53, p. 106, 2019.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology**, Adhesive interactions: The multi-task biochemical toolbox of cancer cells. v. 20, n. 3, p. 161–168, 1 jun. 2010.

CERIC, S. et al. Immunohistochemical expression and prognostic significance of VEGF-C in well-differentiated thyroid cancer. **Acta Endocrinologica (Bucharest, Romania: 2005)**, v. 16, n. 4, p. 409–416, dez. 2020.

CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Current Opinion in Cell Biology**, Cell adhesion and migration. v. 36, p. 13–22, 1 out. 2015.

COLWELL, N. et al. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. **Neuro-Oncology**, v. 19, n. 7, p. 887–896, jul. 2017.

CONLON, G. A.; MURRAY, G. I. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 629–640, 2019.

COPERCHINI, F. et al. Role of chemokine receptors in thyroid cancer and immunotherapy. **Endocrine-Related Cancer**, v. 26, n. 8, p. R465–R478, 1 ago. 2019.

CRAMER, J. D. et al. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. **Surgery**, v. 148, n. 6, p. 1147–1152; discussion 1152–1153, dez. 2010.

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 147, p. 1, 2017.

DAILEY, M. E.; LINDSAY, S.; SKAHEN, R. Relation of thyroid neoplasms to Hashimoto disease of the thyroid gland. **A.M.A. Archives of Surgery**, v. 70, n. 2, p. 291–297, fev. 1955.

DERWAHL, M.; NICULA, D. Estrogen and its role in thyroid cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 21, n. 5, p. T273–T283, 1 out. 2014.

DUDA, I. et al. Plasma Matrix Metalloproteinase-9 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 as Prognostic Biomarkers in Critically Ill Patients. **Open Medicine**, v. 15, p. 50–56, 4 mar. 2020.

EGEBLAD, M.; RASCH, M. G.; WEAVER, V. M. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 697–706, out. 2010.

EL BABA, N. et al. The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2020, p. e2097214, 16 abr. 2020.

GALDIERO, M. R.; VARRICCHI, G.; MARONE, G. The immune network in thyroid cancer. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 6, p. e1168556, jun. 2016.

GARREL, R. et al. Cervical lymphadenopathies signaling thyroid microcarcinoma. Case study and review of the literature. **European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases**, v. 128, n. 3, p. 115–119, jun. 2011.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **The FEBS journal**, v. 278, n. 1, p. 16–27, jan. 2011.

GIRARDI, F. M.; BARRA, M. B.; ZETTLER, C. G. Variants of papillary thyroid carcinoma: association with histopathological prognostic factors. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 6, p. 738–744, 1 nov. 2013.

GIUSSANI, M. et al. Tumor-extracellular matrix interactions: Identification of tools associated with breast cancer progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 3–10, dez. 2015.

GONZALEZ-AVILA, G. et al. Matrix metalloproteinases participation in the metastatic process and their diagnostic and therapeutic applications in cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 137, p. 57–83, 1 maio 2019.

GORDON, M. K.; HAHN, R. A. Collagens. **Cell and tissue research**, v. 339, n. 1, p. 247–257, jan. 2010.

GROGAN, R. H. et al. A study of recurrence and death from papillary thyroid cancer with 27 years of median follow-up. **Surgery**, v. 154, n. 6, p. 1436–1446; discussion 1446–1447, dez. 2013.

GUARINO, V. et al. Thyroid cancer and inflammation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Molecular biology of thyroid cancer. v. 321, n. 1, p. 94–102, 28 maio 2010.

HASHIMOTO, D. et al. Tissue resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. **Immunity**, v. 38, n. 4, 18 abr. 2013.

HAUGEN, B. R. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. **Thyroid**, v. 26, n. 1, p. 1–133, 1 jan. 2016.

HEDINGER, C.; WILLIAMS, E. D.; SOBIN, L. H. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. **Cancer**, v. 63, n. 5, p. 908–911, 1 mar. 1989.

HOREJS, C.-M. Basement membrane fragments in the context of the epithelial-to-mesenchymal transition. **European Journal of Cell Biology**, Integrated mechano-chemical signals in invasion. v. 95, n. 11, p. 427–440, 1 nov. 2016.

HUANG, H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. p. 19, 2018.

IKENAKA, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. **International Journal of Cancer**, v. 105, n. 3, p. 340–346, 2003.

ILIE, M. I. et al. In papillary thyroid carcinoma, TIMP-1 expression correlates with BRAF (V600E) mutation status and together with hypoxia-related proteins predicts aggressive behavior. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 463, n. 3, p. 437–444, set. 2013a.

ILIE, M. I. et al. In papillary thyroid carcinoma, TIMP-1 expression correlates with BRAFV600Emutation status and together with hypoxia-related proteins predicts aggressive behavior. **Virchows Archiv**, v. 463, n. 3, p. 437–444, 1 set. 2013b.

JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; MATEJCZYK, M.; ROSOCHACKI, S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. sup1, p. 177–183, 2016.

JACKSON, H. W. et al. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 38–53, jan. 2017.

JEGERLEHNER, S. et al. Overdiagnosis and overtreatment of thyroid cancer: A population-based temporal trend study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 14 jun. 2017.

JIANG, C. et al. Clinical behaviors of rare variants of papillary thyroid carcinoma are associated with survival: a population-level analysis. **Cancer Management and Research**, v. 10, p. 465–472, 9 mar. 2018.

JIANG, H.-G. et al. [Expression and significance of VEGF, VEGF-C, and VEGF-D in papillary thyroid carcinoma]. **Ai Zheng = Aizheng = Chinese Journal of Cancer**, v. 24, n. 9, p. 1136–1139, set. 2005.

JIN, S. et al. Establishing a prediction model for lateral neck lymph node metastasis in patients with papillary thyroid carcinoma. **Scientific Reports**, v. 8, 26 nov. 2018.

KAIREMO, K.; KANGASMÄKI, A.; BOM, H.-S. Comparison of I-131 Biokinetics after Recombinant Human TSH Stimulation and Thyroid Hormone Withdrawal Measured by External Detector in Patients with Differentiated Thyroid Cancer. **Chonnam Medical Journal**, v. 55, n. 1, p. 20–24, jan. 2019.

KAUSHIK, N. et al. Proinvasive extracellular matrix remodeling for tumor progression. **Archives of Pharmacal Research**, v. 42, n. 1, p. 40–47, 1 jan. 2019.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 52–67, 2 abr. 2010.

KIM, S. et al. The Expression of Tumor-Associated Macrophages in Papillary Thyroid Carcinoma. **Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 192–198, set. 2013.

KRAJEWSKA, J. et al. Early Diagnosis of Low-Risk Papillary Thyroid Cancer Results Rather in Overtreatment Than a Better Survival. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 6 out. 2020.

KWEON, S.-S. et al. Thyroid Cancer is the Most Common Cancer in Women, Based on the Data from Population-based Cancer Registries, South Korea. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 43, n. 10, p. 1039–1046, 1 out. 2013.

LAM, A. K.-Y.; LO, C.-Y.; LAM, K. S.-L. Papillary carcinoma of thyroid: A 30-yr clinicopathological review of the histological variants. **Endocrine Pathology**, v. 16, n. 4, p. 323–330, 1 dez. 2005.

LANDSKRON, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 149185, 2014.

LANG, B. H.-H. et al. Classical and Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma: A Comparative Study on Clinicopathologic Features and Long-term Outcome. **World Journal of Surgery**, v. 30, n. 5, p. 752–758, 1 maio 2006.

LANG, B. H.-H. et al. Staging Systems for Papillary Thyroid Carcinoma. **Annals of Surgery**, v. 245, n. 3, p. 366–378, mar. 2007.

LEE, J.-H. et al. The association between papillary thyroid carcinoma and histologically proven Hashimoto's thyroiditis: a meta-analysis. **European Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 3, p. 343–349, mar. 2013.

LI, Z.-L. et al. Changes in extracellular matrix in different stages of colorectal cancer and their effects on proliferation of cancer cells. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 12, n. 3, p. 267–275, 15 mar. 2020.

LIMA, I. T. D. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES-9 E -26 E DO INIBIDOR TIMP-2 EM PACIENTES PORTADORES DE NÓDULOS BENIGNOS E MALIGNOS DA TIREOIDE. p. 81, 2019.

LIU, F. et al. Postoperative recurrence of papillary thyroid carcinoma with lymph node metastasis. **Journal of Surgical Oncology**, v. 112, n. 2, p. 149–154, 1 ago. 2015.

LIU, J.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 148, p. 355–420, 2017.

LIU, X. et al. Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-9 predicts papillary thyroid carcinoma prognosis. **Oncology Letters**, v. 17, n. 2, p. 2308–2316, fev. 2019.

LORENZO-SANZ, L.; MUÑOZ, P. Tumor-Infiltrating Immunosuppressive Cells in Cancer-Cell Plasticity, Tumor Progression and Therapy Response. **Cancer Microenvironment**, v. 12, n. 2–3, p. 119–132, 3 out. 2019.

MA, Y. et al. Expression of NIS, VEGF-A and Thyroid Autoantibody in Papillary Thyroid Carcinoma with or without Hashimoto's Disease. **ORL; journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties**, v. 81, n. 5–6, p. 281–286, 2019.

MAROTTA, V. et al. Hashimoto's thyroiditis predicts outcome in intrathyroidal papillary thyroid cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 24, n. 9, p. 485–493, set. 2017.

MENG, X.-Y. et al. Níveis imunohistoquímicos de ciclooxygenase-2, metaloproteinase-9 da matriz e fator de crescimento endotelial vascular no carcinoma papilar de tireoide e suas correlações clínico-patológicas. **Journal of International Medical Research**, v. 42, n. 3, p. 619–627, 1 jun. 2014.

MIAO, C. et al. Prognostic role of matrix metalloproteinases in bladder carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 32309–32321, 4 mar. 2017.

MIN, B. S. et al. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. **Oncology Letters**, v. 4, n. 1, p. 123–130, jul. 2012.

MONDAL, S. et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 194, p. 112260, 15 maio 2020.

MOTT, J. D.; WERB, Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 558–564, 1 out. 2004.

MYUNG, S.-K. et al. Risk Factors for Thyroid Cancer: A Hospital-Based Case-Control Study in Korean Adults. **Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 49, n. 1, p. 70–78, jan. 2017.

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, n. 2, p. 276–293, abr. 2014.

NOURELDINE, S. I.; TUFANO, R. P. Association of Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 27, n. 1, p. 21–25, jan. 2015.

ODA, H. et al. Incidences of Unfavorable Events in the Management of Low-Risk Papillary Microcarcinoma of the Thyroid by Active Surveillance Versus

Immediate Surgery. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 26, n. 1, p. 150–155, jan. 2016.

PANG, L. et al. Correlations of TNM staging and lymph node metastasis of gastric cancer with MRI features and VEGF expression. **Cancer Biomarkers**, v. 23, n. 1, p. 53–59, 1 jan. 2018.

PESTA, M. et al. Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. **Anticancer Research**, v. 27, n. 4A, p. 1863–1867, ago. 2007.

QUINTERO-FABIÁN, S. et al. Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 6 dez. 2019.

RICCI, S.; BRUZZESE, D.; DI CARLO, A. Evaluation of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, NGAL and MMP-9/NGAL complex in urine and sera from patients with bladder cancer. **Oncology Letters**, v. 10, n. 4, p. 2527–2532, out. 2015.

SAKATA, K. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. **International Journal of Oncology**, v. 17, n. 4, p. 673–754, 1 out. 2000.

SCHEAU, C. et al. **The Role of Matrix Metalloproteinases in the Epithelial-Mesenchymal Transition of Hepatocellular Carcinoma**. Review Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/acp/2019/9423907/>>. Acesso em: 15 out. 2020.

ŠELEMETJEV, S. et al. Coexpressed High Levels of VEGF-C and Active MMP-9 Are Associated With Lymphatic Spreading and Local Invasiveness of Papillary Thyroid Carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 146, n. 5, p. 594–602, 1 nov. 2016.

SEVIC, I. et al. The Role of the Tumor Microenvironment in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma. In: TIRNITZ-PARKER, J. E. E. (Ed.). **Hepatocellular Carcinoma**. Brisbane (AU): Codon Publications, 2019.

SHIN, C.-H. et al. Prognostic value of tumor size and minimal extrathyroidal extension in papillary thyroid carcinoma. **The American Journal of Surgery**, v. 220, n. 4, p. 925–931, 1 out. 2020.

SHUMAN MOSS, L. A.; JENSEN-TAUBMAN, S.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix Metalloproteinases: Changing Roles in Tumor Progression and Metastasis. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 6, p. 1895–1899, 1 dez. 2012.

SIPOS, J. A.; MAZZAFERRI, E. L. Thyroid Cancer Epidemiology and Prognostic Variables. **Clinical Oncology**, v. 22, n. 6, p. 395–404, 1 ago. 2010.

SOH, E. Y. et al. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. **Surgery**, v. 120, n. 6, p. 944–947, dez. 1996.

SONG, Y. S. et al. Aberrant Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Signaling Increases VEGF-A and CXCL8 Secretion of Thyroid Cancer Cells, Contributing to Angiogenesis and Tumor Growth. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 1, p. 414–425, 1 jan. 2019.

SULAIEVA, O. et al. Mechanisms of the Impact of Hashimoto Thyroiditis on Papillary Thyroid Carcinoma Progression: Relationship with the Tumor Immune Microenvironment. **Endocrinology and Metabolism**, v. 35, n. 2, p. 443–455, jun. 2020a.

SULLIVAN, S. A. Thyroid Nodules and Thyroid Cancer in Pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 62, n. 2, p. 365–372, jun. 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SZARVAS, T. et al. Matrix metalloproteinases and their clinical relevance in urinary bladder cancer. **Nature Reviews. Urology**, v. 8, n. 5, p. 241–254, maio 2011.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Extracellular Matrix (ECM) and ECM-like materials: Therapeutic Tools and Targets in Cancer Treatment. v. 97, p. 4–27, 1 fev. 2016.

TRAN, B. et al. The Prognostic Impact of Tumor Size in Papillary Thyroid Carcinoma is Modified by Age. **Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association**, v. 28, n. 8, p. 991–996, ago. 2018.

TUTTLE, R. M. et al. Thyroid Carcinoma. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 8, n. 11, p. 1228–1274, 1 nov. 2010.

VUONG, H. G. et al. Prognostic implication of BRAF and TERT promoter mutation combination in papillary thyroid carcinoma-A meta-analysis. **Clinical Endocrinology**, v. 87, n. 5, p. 411–417, nov. 2017.

WAJNER, S. M. et al. Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression is associated with advanced medullary thyroid carcinoma. **Oncology Letters**, v. 7, n. 3, p. 731–737, mar. 2014.

WALKER, C.; MOJARES, E.; DEL RÍO HERNÁNDEZ, A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3028, out. 2018.

WANG, T. et al. [Pathologic study of expression and significance of matrix metalloproteinases-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, vascular endothelial growth factor and transforming growth factor beta-1 in papillary

carcinoma and follicular carcinoma of thyroid]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi = Chinese Journal of Pathology**, v. 38, n. 12, p. 824–828, dez. 2009.

XU, Y.; XU, L.; WANG, J. Clinical predictors of lymph node metastasis and survival rate in papillary thyroid microcarcinoma: analysis of 3607 patients at a single institution. **Journal of Surgical Research**, v. 221, p. 128–134, 1 jan. 2018.

YANG, Q. et al. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 mRNA and Vascular Endothelial Growth Factor Protein in Gastric Carcinoma and Its Relationship to Its Pathological Features and Prognosis. **The Anatomical Record**, v. 293, n. 12, p. 2012–2019, 2010.

YE, X.; WEINBERG, R. A. Epithelial–Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 675–686, 1 nov. 2015.

YLISIRNIÖ, S. et al. Elevated Serum Levels of Type I Collagen Degradation Marker ICTP and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) 1 Are Associated with Poor Prognosis in Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. 1633–1637, 1 jun. 2001.

YWATA DE CARVALHO, A.; CHULAM, T. C.; KOWALSKI, L. P. Long-term Results of Observation vs Prophylactic Selective Level VI Neck Dissection for Papillary Thyroid Carcinoma at a Cancer Center. **JAMA otolaryngology-head & neck surgery**, v. 141, n. 7, p. 599–606, jul. 2015.

ZHANG, L. et al. A new particle swarm optimization algorithm with adaptive inertia weight based on Bayesian techniques. **Applied Soft Computing**, v. 28, p. 138–149, 1 mar. 2015.

ZHANG, S. et al. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 9, n. 5, p. 899–904, 15 maio 2003.

ZHANG, Y. et al. The study of the coexistence of Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 6, p. 1021–1026, 1 jun. 2014.

ZHANG, Y. et al. Values of ultrasound features and MMP-9 of papillary thyroid carcinoma in predicting cervical lymph node metastases. **Scientific Reports**, v. 7, 27 jul. 2017.

ZHOU, W. et al. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 indicates poor prognosis in glioma recurrence. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109369, 1 out. 2019.

ZHU, F. et al. The Effects of Hashimoto Thyroiditis on Lymph Node Metastases in Unifocal and Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. **Medicine**, v. 95, n. 6, 12 fev. 2016.

ANEXO

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização da expressão da Metaloproteinase-9 e TIMP-1 na invasão e metástase do carcinoma papilífero de tireóide

Pesquisador: JANAINA REGINA LELLIS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 25012919.9.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.709.741

Apresentação do Projeto:

O carcinoma papilífero da tireóide (CPT) é um tumor diferenciado responsável por 85% dos casos de cânceres da tireóide, com maior incidência em mulheres. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa no ano de 2018 foi cerca de 9.610 casos de carcinoma papilífero da tireóide, onde 8.040 casos acometeram mulheres (CARVALHO, 2018; LIMA, 2019; ZHANG et al., 2013). Embora o CPT configure um bom prognóstico devido ao seu crescimento lento, cerca de 15% dos casos evoluem com invasão local, ocasionando metástases para linfonodos cervicais, aumentando a resistência ao tratamento e taxa de mortalidade (ZHANG et al., 2013; LIMA, 2019). As metaloproteinases de matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais de metaloproteinases os TIMPs, estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos, incluindo o câncer, com capacidade de degradar e remodelar os componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal. As MMPs e os TIMPs no processo carcinogênico estão relacionados com o crescimento celular, apoptose, invasividade, processo de angiogênese e metástases. Deste modo, a compreensão dos mecanismos efetores pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias para diagnóstico precoce, prognóstico e tratamento (MENG et al., 2014; ZHANG et al., 2017).

Objetivo da Pesquisa:

Realizar um estudo de caracterização da expressão imunohistoquímica da MMP-9 e TIMP-1 em amostras histopatológicas em pacientes com carcinoma papilífero da tireóide, correlacionando

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 3.709.741

com o desenvolvimento de metástases e com os dados clínicos de modo que possa colaborar com a avaliação diagnóstica e prognóstica da doença

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O presente projeto oferece riscos mínimos, apenas associados a quebra de confidencialidade de dados.

Benefícios: Contribuir para a melhora no entendimento sobre a progressão tumoral no carcinoma papilífero de tireóide, através de enzimas proteolíticas, avaliando o potencial prognóstico da metaloproteinases de matriz (MMP-9) e seu inibidor (TIMP-1).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo baseia-se em uma análise retrospectiva de casos de carcinoma papilífero de tireóide tratados cirurgicamente, dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- HC-FMRP (USP), onde serão selecionados 30 blocos de parafina contendo amostras de carcinoma papilífero da tireóide, diagnosticados entre 2010 a 2015. Para o estudo, as lâminas arquivadas coradas por hematoxilina-eosina (HE) serão reavaliadas pelo patologista responsável para certificar o diagnóstico e selecionar as blocos de amostras de biópsias com áreas de lesão, mais representativas. Posteriormente, será avaliado a expressão da MMP-9 e TIMP-1 utilizando da técnica de imunistoquímica em carcinomas papilíferos de tireóide.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. Solicita a dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. trata-se de um estudo retrospectivo a partir de casos dos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- HC-FMRP (USP) de amostras de carcinoma papilífero da tireóide tratados cirurgicamente, onde os pacientes submetidos ao processo cirúrgico assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que permite a utilização de todos os dados clínicos e patológicos que constem em seu prontuário, resguardando-se o sigilo sobre sua identidade.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como a solicitação de dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 02 de 03

Continuação do Parecer: 3.709.741

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1448541.pdf	05/11/2019 14:16:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/11/2019 14:14:30	JANAINA REGINA LELLIS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	01/11/2019 10:28:52	JANAINA REGINA LELLIS	Aceito
Orçamento	upc.pdf	01/11/2019 10:26:34	JANAINA REGINA LELLIS	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	01/11/2019 10:23:54	JANAINA REGINA LELLIS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 18 de Novembro de 2019

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO B – Classificação de Estadiamento TNM 7º edição

Critérios de estadiamento – TNM

CATEGORIA TNM	CRITÉRIOS
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
T1a	Tumor com diâmetro de 1 cm ou menos em sua maior dimensão e limitado à tireoide.
T1b	Tumor com diâmetro de mais de 1 cm e com até 2 cm em sua maior dimensão e limitado à tireoide.
T2	Tumor com diâmetro mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão e limitado à tireoide.
T3	Tumor com mais de 4 cm restrito à tireoide ou qualquer tumor com mínima extensão extratireoidiana.
T4a	Tumor de qualquer tamanho que se estende além da cápsula tireoidiana e invade tecidos moles subcutâneos, laringe, traqueia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente.
T4b	Tumor com invasão de fáscia pré-vertebral ou vasos mediastinais ou envolve a artéria carótida.
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais.
N1a	Metástases linfáticas em nível VI (compartimento central).
N1b	Metástases em outros linfonodos cervicais unilaterais, bilaterais ou contralaterais (níveis I, II, III, IV ou V) ou em linfonodo retrofaringeo ou mediastinal superior.
M0	Ausência de metástase(s) à distância.
M1	Presença de metástase(s) à distância.

Quadro 3 – Estágios tumorais segundo a Classificação TNM

ESTÁGIO	IDADE ABAIXO DE 45 ANOS	IDADE ACIMA DE 45 ANOS
I	Qualquer T, qualquer N, M0.	T1a, T1b, N0, M0.
II	Qualquer T, qualquer N, M1.	T2, N0, M0.
III		T3, N0, M0. T1, T2, T3, N1a, M0.
IVA		T1, T2, T3, N1b, M0. T4a, N0, N1, M0.
IVB		T4b, qualquer N, M0.
IVC		Qualquer T, qualquer N, M1.

Adaptado de (Portaria SAS/MS nº7 de 2014)