

ALTINO FILIPE TEIXEIRA PEREIRA

Estudo da densidade linfática nos tumores da tiróide: correlação com a metastização ganglionar.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador: Professor Doutor Valeriano Leite (MD, PhD)

Categoria – Professor Auxiliar Convidado

Afiliação – Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa da Universidade de Lisboa

Co-orientador: Professora Doutora Mariana Monteiro (MD, PhD)

Categoria – Professora Associada

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Teixeira Pereira, Altino Filipe

Estudo da densidade linfática nos tumores da tiróide:
correlação com a metastização ganglionar/ Altino Filipe Teixeira
Pereira / Porto / 2014

Dissertação na área de Oncologia; Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto

Orientador: Valeriano Leite (MD, PhD)

Co-orientador: Mariana P. Monteiro (MD, PhD)

Inclui bibliografia

Agradecimentos

Começo por agradecer à Professora Berta Martins e à Professora Mariana P Monteiro, pela ajuda, atenção, e pela oportunidade que me concederam em trabalhar na sua equipa. Ao Professor Valeriano Leite, meu orientador, que me conduziu neste percurso.

Estou enormemente grato ao Professor Carlos Lopes, pela sua disponibilidade em delimitar os tumores da tiróide. Sem a sua ajuda este trabalho não teria sido possível.

Agradeço à Sofia Pereira, Ângela Moreira e ao Tiago Morais, pela ajuda e auxílio que me prestaram e pela disponibilidade. E, claro, à Madalena, pelo reforço e palavras amigas e a toda a equipa do Departamento de Anatomia. Muito Obrigado por tudo.

Agradeço também à Professora Paula Sampaio e ao Professor Pedro Quelhas, pela ajuda que me prestaram na execução da minha tese e pelo uso dos seus equipamentos.

Não me esqueço também de agradecer à Dra. Susana S. Almeida e à Dra. Ana Machado pela ajuda e incentivo e à Professora Dolores Resende que é para mim uma das referências académicas que mais me marcou.

À Belinha Teixeira e à Sandra Sorte pela caminhada que fizeram comigo na elaboração da minha dissertação de mestrado.

E claro agradeço aos meus Pais e ao meu Avô, por todas palavras meigas que me deram e pelo seu apoio incondicional.

Epígrafe

“A leitura após certa idade distrai excessivamente o espírito humano das suas reflexões criadoras. Todo o homem que lê de mais e usa o cérebro de menos adquire a preguiça de pensar”

«Albert Einstein»

Resumo

As metástases são a principal causa de morte em doentes com cancro e resultam da disseminação das células tumorais por via sanguínea ou linfática. Na glândula tiroideia podem surgir carcinomas com origem na célula folicular, que tendem a metastizar por vias diferentes, constituindo um ótimo modelo para estudar os mecanismos de angiogénese e linfoangiogénese, associados à progressão e disseminação neoplásica.

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a densidade vascular linfática intratumoral, peritumoral e no parênquima não tumoral associado aos tumores da tiroide e a sua correlação com os parâmetros clinico-patológicos.

Para tal, recorreu-se à marcação por IHQ para o marcador linfático D2-40 dos cortes histológicos de carcinomas papilares da variante clássica (n=21) e folicular (n=12) e de carcinomas medulares (n=17), tendo sido realizada a análise morfométrica computadorizada da marcação.

Observou-se que a densidade linfática do tecido tiroideu normal e peritumoral é superior nos carcinomas medulares, em comparação com as mesmas regiões dos carcinomas papilares, das variantes, clássica ou folicular. Não foram encontradas diferenças significativas na densidade linfática do parênquima não tumoral ou peritumoral entre os dois tipos de tumores papilares, nem qualquer relação com a extensão extra-tiroideia ou invasão ganglionar, que possam justificar o distinto padrão de disseminação. Pelo contrário, foi observada uma maior densidade linfática no tecido intratumoral associado aos carcinomas papilares da variante clássica em comparação a variante folicular, especialmente nos doentes do sexo feminino. Embora não tenham sido encontradas correlações entre a densidade linfática e os diferentes parâmetros associados à disseminação e metastização tumoral.

Em conclusão: A densidade linfática intratumoral está aumentada dos doentes com carcinoma papilar da variante clássica e no tiroideu normal peritumoral dos doentes com carcinoma medular, sugerindo que as diferenças na densidade da rede linfática possam contribuir para o risco de metastização tumoral.

LINFOANGIOGÉNESE; D2-40; TIRÓIDE; TUMORES DA TIRÓIDE; CARCINOMA PAPILAR; CARCINOMA MEDULAR;

Abstract

Metastases are the main cause of death in cancer patients, resulting from the spread of tumor cells through blood or lymphatic vessels. In the thyroid gland, two different carcinomas arising from the same follicular cell, tend to metastasize through different vascular routes, being good model to study the mechanisms of angiogenesis and lymphangiogenesis associated with the tumor progression.

The aim of this study was to evaluate the lymph vessel density in intratumoral, peri-tumoral and normal thyroid tissue associated with thyroid tumors, and its correlation with clinic-pathological parameters.

For that purpose, histological sections of medullary carcinomas (n = 17) and papillary carcinomas of the classic (n = 21) and follicular variants (n = 12) were stained by the IHC method for the lymphatic marker D2-40 and submitted to computerized morphometric analysis.

It was observed that the lymphatic density was higher in the peritumoral and normal tissue surrounding medullary carcinomas when compared with papillary carcinomas, either of the follicular or classic variants. No significant differences were found in the lymphatic density of the peritumoral and normal tissue between the two variants of papillary tumors. No correlations were found between the lymphatic density and the extra-thyroid extension or lymph node involvement that could justify the distinct pattern of tumoral spread. On the contrary, the intratumoral lymph vessel density was higher in the classical variant of papillary carcinoma compared with the follicular variant, particularly in female patients.

In conclusion, lymphatic density is higher in the intra-tumoral tissue of papillary carcinomas and normal peri-tumoral tissue of patients with thyroid medullary carcinoma, suggesting that the observed differences in the lymph network could contribute to the distinctive risk of metastasizing.

LINPHANGIOGENESIS; D2-40; THYROID; THYROID TUMOURS; PAPILLARY
CARCINOMA; MEDULAR CARCINOMA

Índice

1. Introdução	15
1.1. Patologia neoplásica da tiróide	16
1.1.1. Carcinomas Papilares.....	22
1.1.2. Carcinomas Foliculares	27
1.1.3. Carcinomas Medulares.....	30
1.1.4. Carcinomas Anaplásicos	32
1.2. Metástases tumorais	32
1.3. Linfoangiogénese como fator para a ocorrência de metastização.	33
1.4. Linfoangiogénese na tiróide.	35
1.4.1. Marcadores linfáticos.....	37
2. Objetivo	39
3. Material e Métodos.....	40
3.1. Seleção de Doentes.....	40
3.2. Coloração de Hematoxilina-Eosina	40
3.3. Imunohistoquímica pelo D2-40.....	40
3.3.1. Aquisição das imagens.....	42
3.3.2. Processamento e análise das imagens obtidas.....	42
3.4. Análise estatística	46
4. Resultados.....	48
4.1. Características demográficas da amostra	48
4.2. Avaliação das densidades linfáticas pela marcação do D2-40	55
4.2.1. Densidade linfática intratumoral	56
4.2.2. Densidade linfática peritumoral	58
4.2.3. Densidade linfática no tecido tiroideu normal.	61
5. Discussão	65

6. Conclusão	69
7. Bibliografia	70

Índice de figuras

Figura 1 – Ilustração anatómica da glândula tiróide, é composta por dois lobos, um direito e um esquerdo, unidos por um istmo, a partir do qual se projeta o lobo piramidal.....	15
Figura 2 – Ilustração esquemática das origens das neoplasias da tiróide. Demonstra a evolução da “desdiferenciação” dos tumores oriundos das células epiteliais da tiróide.	17
Figura 3 - Imagem histológica de um carcinoma papilar, variante clássica. Seta: Complexo papilar. Células apresentando uma desorganização nuclear, aglomeração e sobreposição nuclear. (coloração HE, ampliação 80x)	25
Figura 4 – Imagem histológica de um carcinoma papilar variante folicular. Asterisco: Colóide hípereosinófilo. Seta: Estrutura folicular (coloração HE, ampliação 20x). ...	26
Figura 5 - Imagem histológica de um carcinoma medular, demonstrando um crescimento destrutivo e pleomorfismo nuclear. Asterisco: Amilóide (coloração HE, ampliação 80x).....	30
Figura 6 – Ilustração demonstrando a angiogénese e a linfoangiogénese tumoral. A amarelo estão representados os vasos linfáticos, a azul as veias e vénulas e a vermelho as artérias e arteríolas.....	33
Figura 7 - Fotografia de Imunohistoquímica para o D2-40, evidenciando os vasos linfáticos (castanho) com contrastação nuclear a hematoxilina (azul) no tecido tiroideu normal (Imunohistoquímica D2-40, ampliação 200x)	38
Figura 8 - Ilustração das áreas de tecido tumoral, peritumoral (offset's) e tecido normal.....	43
Figura 9 - Ilustração da decomposição de uma imagem RGB (Red, Green, Blue) ..	43
Figura 10 - Ilustração do Threshold para os brancos e para a marcação imunohistoquímica pelo D2-40.....	44
Figura 11 Ilustração do offset's onde se procederam aos cálculos de subtração da área verde pela área amarela. A – Demonstração da região peritumoral 1, a verde.	

B – demonstração da região peritumoral 2, a verde. C – Demonstração da região peritumoral 3, a verde.	46
Figura 12 - Gráficos ilustrando as percentagens de tumores da tiróide de acordo com a sua classificação patológica T (A) N (B) M (C).....	50
Figura 13 – A – Gráfico comparando o número de casos em relação a extensão extra-tiroideia, nos diferentes tipos de carcinomas. B – Gráfico comparando o número de casos em relação à classificação patológica N, nos diferentes tipos de carcinomas. C – Gráfico comparando o número de casos em relação à classificação patológica N, nos diferentes tipos de carcinomas	52
Figura 14 - A – Representação gráfica do Diâmetro tumoral da totalidade dos tumores estudados de acordo com o género. B – Diâmetro tumoral de acordo com o género, nos diferentes tipos histológicos de carcinomas. C – Estadio T da totalidade dos tumores de acordo com o género. D – Distribuição da frequência dos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tiróide de acordo com o género.	54
Figura 15 – Fotografia de um carcinoma medular. Asterisco: Tecido tumoral. Seta: tecido tiroideu normal. A – Imagem de imunohistoquímica (ampliação 20x). B - Imagem resultante do Fiji, realçando a marcação a branco (ampliação 20x)	55
Figura 16 - Densidade linfática intratumoral associada aos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tiroide (A) e de acordo com o género (B).	56
Figura 17 - Gráfico relacionando a densidade linfática intratumoral com o tipo histológico de carcinoma e se metastiza.....	57
Figura 18 – A e B – Gráficos relacionando a densidade linfática intratumoral com o tipo histológico de carcinoma em relação a extensão extra-tiroideia e a classificação patológica N.	58
Figura 19 – Fotografia de um carcinoma medular, realçando as zonas peritumorais (offset's) e o tecido normal. CM- Carcinoma Medular; TN – Tecido Normal. (Imunohistoquímica para o D2-40, ampliação 80x).....	58
Figura 20 – A, B, C e D Densidade linfática nas zonas peritumorais (offset 1, 2, 3 e total) nos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tiroide, sendo significativamente superior nos carcinomas medulares em comparação com os carcinomas papilares da variante clássica em todas as áreas de interesse avaliadas ($p < 0,05$).....	59
Figura 21 – A - A densidade linfática peritumoral total em relação à extensão extratumoral, nos diferentes tipos de carcinomas. B - A densidade linfática	

peritumoral total de acordo com a classificação patológica N, nos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tiroide. C - A densidade linfática peritumoral total em relação à classificação patológica M, nos diferentes tipos de carcinomas.....	61
Figura 22 - Gráfico ilustrando a densidade linfática do tecido tiroideu normal nos diferentes carcinomas.	62
Figura 23 - A Densidade linfática do tecido tiroideu normal em relação à extensão extratumoral, nos diferentes tipos de carcinomas. B - Densidade linfática do tecido tiroideu normal de acordo com a classificação patológica N, nos diferentes tipos histológicos de carcinomas C – Densidade linfática do tecido tiroideu normal de acordo com a classificação patológica M.	63
Figura 24 - A - Fotografia de uma lâmina histológica em HE com carcinoma papilar variante clássica à esquerda e tecido tiroideu normal a direita (ampliação ~ 20x). B - fotografia da mesma lâmina e do mesmo segmento, mas em IHQ para o D-40, com ampliações de 2 segmentos representando as áreas intratumorais e de tecido tiroideu normal.	63
Figura 25 - Gráfico demonstrando a densidade linfática nas diferentes regiões do tecido comparadas com o tipo histológico do carcinoma da tiróide	64

Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação das neoplasias epiteliais e com origem nas células C da tiróide. Adaptado de Kumar & Kumar, 2010; Schlumberger & Pacini, 1997)	16
Tabela 2 - Características moleculares e o perfil mutacional dos carcinomas da tiróide. Adaptado de Omur O. & Baran Y. (2014).....	18
Tabela 3 - Estadiamento TNM, patológico e clínico. Adaptado da AJCC 2010.....	20
Tabela 4 - Associação da classificação (TNM) ao grupo de prognóstico. Adaptado da AJCC 2010.....	21
Tabela 5 - Características clínicas dos carcinomas papilares. Adaptado de Thompson, 2012 e Nikifovor & Nikiforova, 2011.	24
Tabela 6 - Características clínicas dos carcinomas foliculares. Adaptado de Thompson, 2012 e Nikifovor & Nikiforova, 2011.	29

Tabela 7 - Características clínicas dos carcinomas medulares. Adaptado de Thompson, 2012 e Nikifovor & Nikiforova, 2011.	31
Tabela 8 - Tabela dos principais marcadores linfáticos. Adaptado de (Massi & Gokoz, 2010).....	37
Tabela 9 - Tabela relacionando as diferentes categorias com carcinomas papilares variante clássica e variante folicular e com os carcinomas medulares da tiróide.....	48

Abreviaturas

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CCL21	Quimosina ligando 21
CPVC	Carcinoma papilar variante clássica
CPVF	Carcinoma papilar variante folicular
EET	Extensão extra-tiroideia
HE	Hematoxilina-Eosina
IHQ	Imunohistoquímica
MEN	Neoplasias Endócrinas Múltiplas
T ₃	Tri-iodotironina
T ₄	Tetra-iodotironina
TNM	Estadiamento patológico TNM
TRH	Hormona libertadora da tireotropina
TSH	Tireotropina
VEGF-C	fator de crescimento vascular endotelial C

1. Introdução

A tiróide é uma glândula endócrina, do grego *éndon*, «dentro» e *krínein*, «segregar» que significa segregar para dentro, ou seja, uma glândula que secreta substâncias diretamente para a corrente sanguínea do organismo. A origem do seu nome advém do grego *thyreós*, «escudo» e *eidos (oidés)*, «semelhante», ou seja, semelhante a um escudo, embora quando visualizada a sua face anterior se assemelhe a uma borboleta (Figura 1). A função da glândula tiróide está sob o controlo do eixo hipotálamo-hipófise, a sua importância está relacionada com as suas funções de regulação do metabolismo corporal e da homeostasia do cálcio (Drake, Vogl, Mitchell, Gray, & Gray, 2010; Mescher & Junqueira, 2010).

A tiróide é uma glândula composta por dois lobos laterais unidos por um istmo (Mescher & Junqueira, 2010) e no adulto com níveis suficientes de iodo pesa cerca de 15-20 gramas (Schlumberger & Pacini, 1997).

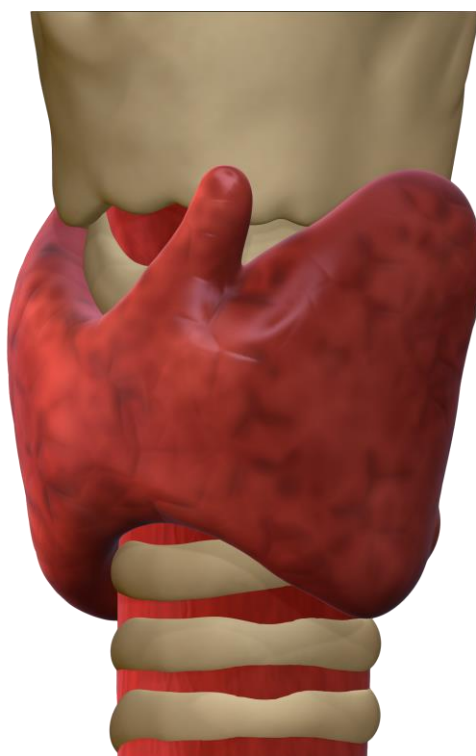


Figura 1 – Ilustração anatômica da glândula tiróide, é composta por dois lobos, um direito e um esquerdo, unidos por um istmo, a partir do qual se projeta o lobo piramidal.

1.1. Patologia neoplásica da tiróide

As patologias neoplásicas da tiróide encontram-se na lista dos 20 cancros mais comuns (Globocan, 2012). Porém pode considerar-se uma patologia relativamente rara, uma vez que apenas aproximadamente 3% dos casos de cancro em cada ano correspondem a patologia neoplásica da tiróide (Dellaire, Berman, & Arceci, 2014; Thompson, 2012). Contudo, é a patologia neoplásica mais frequente dentro das neoplasias endócrinas e a sua incidência tem aumentado nas últimas décadas (Dellaire et al., 2014).

Segundo dados epidemiológicos, as neoplasias da tiróide, têm uma maior incidência no sexo feminino e nos países asiáticos (Globocan, 2012). Em contraste, quando as neoplasias da tiróide ocorrem no sexo masculino são geralmente mais agressivas (Globocan, 2012). A grande maioria das neoplasias da tiróide apresentam-se como nódulos solitários, embora a taxa de malignidade dos nódulos da tiróide seja baixa, pois apenas cerca de 5% de todos os nódulos são malignos (Schlumberger & Pacini, 1997).

As neoplasias da tiróide mais frequentes derivam das células foliculares ou das células para-foliculares ou também designadas por células C. Os tumores com origem epitelial, derivados das células foliculares, podem dividir-se em diferenciados e indiferenciados (Tabela 1). Os carcinomas diferenciados podem subdividir-se em carcinomas papilares e carcinomas foliculares, enquanto os tumores indiferenciados se denominam carcinomas anaplásicos (Kumar & Kumar, 2010; Schlumberger & Pacini, 1997).

Tabela 1 - Classificação das neoplasias com origem nas células foliculares e com origem nas células C da tiróide. Adaptado de Kumar & Kumar, 2010; Schlumberger & Pacini, 1997)

Tumores com origem nas células foliculares	Tumores Diferenciados	Carcinoma Papilar	Variante Clássica
			Variante Folicular
			Variante de Células Altas
			Variante esclerosante Difusa
			Outras Variantes
		Carcinoma Folicular	Variante Clássica

		Variante Oncocítica
	Tumores pouco diferenciados	
	Tumores Indiferenciados	Carcinoma Anaplástico
Tumores com origem nas Células C	Carcinoma Medular	

Estes tumores da tiróide têm frequências diferentes (Kumar & Kumar, 2010):

- Carcinomas Papilares: > 85 % dos casos
- Carcinomas Foliculares: 5% a 15% dos casos
- Carcinomas Anaplásicos: < 5% dos casos
- Carcinoma Medular: 5% dos casos

O adenoma folicular é uma patologia benigna e presume-se que poderá ser o precursor do carcinoma folicular da tiróide (Dellaire et al., 2014). Por sua vez, os tumores menos diferenciados como o carcinoma anaplásico ou o carcinoma pouco diferenciado, poderão ser uma patologia *de novo* das células foliculares ou resultar da desdiferenciação dos carcinomas diferenciados da tiróide (Figura 2) (Dellaire et al., 2014).

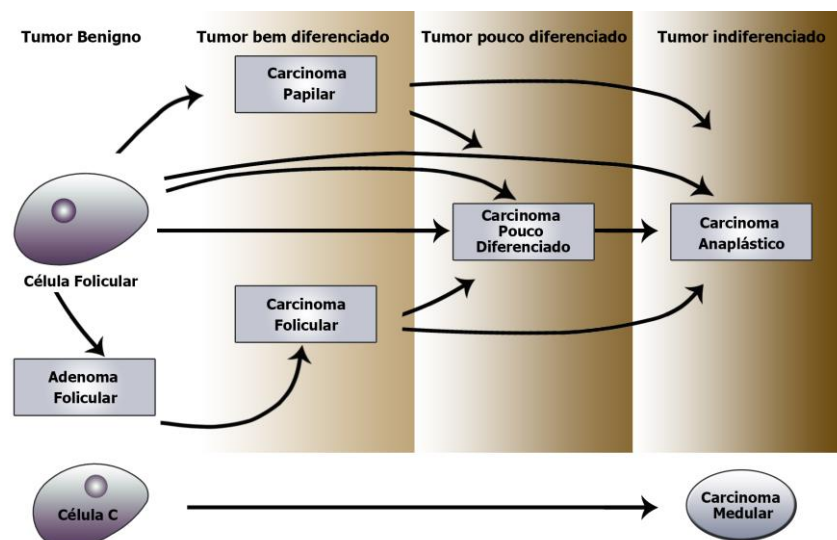


Figura 2 – Ilustração esquemática das origens das neoplasias da tiróide. Demonstra a evolução da “desdiferenciação” dos tumores oriundos das células epiteliais da tiróide.

Subjacentes à progressão neoplásica das células da tiróide, já foram identificadas múltiplas vias genéticas, sendo que algumas são específicas dos cancros da tiróide, como a fusão *PAX8-PPARY1* (no carcinoma folicular) e rearranjos cromossómicos envolvendo o oncogene *RET* (nos carcinomas papilares) e mutações no *RET* (nos carcinomas medulares) (Tabela 2)(Omur & Baran, 2014).

Tabela 2 - Características moleculares e o perfil mutacional dos carcinomas da tiróide. Adaptado de Omur O. & Baran Y. (2014)

Tipo de tumor	Prevalência (% de cancros de tiróide)	Sobrevivência aos 10 anos (%)	Mutações observadas e a sua prevalência	Efeitos dessas mutações no tumor
Carcinoma papilar	80-85	95-98	BRAF (V600E) 45% RET/PTC 20% RAS 10% TRK <5%	Promove a tumorigénese, invasão, metástases, recorrência e mortalidade
Carcinoma folicular	10-15	90-95	RAS 45% PAX8-PPARy 35% PIK3CA <10% PTEN <10% BRAF (V600E) <10%	Promove a tumorigénese, invasão, metástases, recorrência e mortalidade
Carcinoma medular	3-5	60-80	Formas familiares do RET > 95% Formas esporádicas do RET 50% TP53 70%	Promove a tumorigénese, invasão, metástases, recorrência e mortalidade
Carcinoma anaplástico	1-2	<10	BETA CATENINA 65% RAS 55% BRAF 20% PIK3CA 20% PTEN <10% AKT 10%	Promove a tumorigénese, invasão, metástases, recorrência e mortalidade

A maioria dos tumores diferenciados da tiróide tem um bom prognóstico a longo-prazo, porém em 20 % dos casos a terapêutica falha devido a recorrência da doença no local ou à distância, perda da capacidade de captação de iodo ou em casos mais raros devido à progressão de tumores bem diferenciados para tumores pouco diferenciados ou indiferenciados (Dellaire et al., 2014).

Existem vários fatores que podem influenciar o prognóstico da doença como a histologia, tamanho do tumor, invasão para os gânglios linfáticos, extensão extra-tiroidea, existência de metástases à distância e oncogenes que estão diretamente correlacionados com um melhor ou pior prognóstico (Sipos & Mazzaferri, 2010). Além do mais, as variáveis dependentes do doente, como o sexo e a idade, também têm um grande impacto no prognóstico (Sipos & Mazzaferri, 2010).

Dentro dos vários fatores que influenciam o prognóstico, o tipo histológico do tumor, tem particular relevância. Os carcinomas papilares e foliculares (tumores diferenciados) têm uma maior taxa de sobrevida enquanto, que os carcinomas medulares e anaplásicos são mais agressivos (Sipos & Mazzaferri, 2010). A densidade linfática intratumoral presente nos carcinomas papilares da tiróide, também foi relacionada com a probabilidade de desenvolvimento de metástases para os nódos linfáticos, motivo pelo qual foi considerada um indicador preditivo para do risco de desenvolvimento de metástases para os gânglios linfáticos cervicais (Choi et al., 2012).

O tamanho do tumor também se correlaciona com a probabilidade de progressão da doença nos carcinomas papilares, sendo que tumores maiores estão associados a um maior risco de presença de metástases locoregionais e metástases a distância, assim como de recorrência da doença e mortalidade (Sipos & Mazzaferri, 2010).

O género do doente também influencia o prognóstico, uma vez que a mortalidade e as taxas de recorrência são maiores no homem, sendo que este apresenta mais do dobro de metástases a distância (9 vs 4%) (Sipos & Mazzaferri, 2010). Assim como a idade, uma vez que indivíduos com menos de 40 anos ou mais de 60 anos têm uma taxa de recorrência superior (Sipos & Mazzaferri, 2010).

No sentido de prever o prognóstico dos doentes em função dos diferentes parâmetros clínicos e patológicos, foram propostos vários sistemas de estadiamento para os tumores da tiróide ao longo das últimas 3 décadas. O primeiro sistema de estadiamento foi desenvolvido em 1987 por Hay *et al* e foi denominado de *AGES - Age, Grade, Extent, Size* por recorrer aos fatores idade,

grau, extensão e tamanho tumoral para estadiar os tumores da tiróide. Mais tarde foi sucedido pelos sistemas *AMES – Age, Metastasis, Extent, Size* e *MACIS – Age, Completeness of resection, Invasion beyond gland, Size*. Porém, o modelo de estadiamento mais universal e em paralelo com o sistema para estadiar outros tumores é a da classificação *TNM – Tumor, lymphatics Nodules, Metastasis* (Tabela 3) e adaptado pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC), tendo introduzido também a variável idade (Tabela 4).

Tabela 3 - Estadiamento *TNM*, patológico e clínico. Adaptado da AJCC 2010

ESTADIO PATOLÓGICO TNM (PREFIXO “P”)	CATEGORIAS DO ESTADIO	ESTADIO CLINICO TNM (PREFIXO “C”)
T		
TX	O tumor primário não pode ser avaliado	TX
T0	Sem evidência do tumor primário.	T0
T1	Tumor com 2 cm ou menos circunscrito a tiroide.	T1
T1a	Tumor com 1 cm ou menos circunscrito a tiroide.	T1a
T1b	Tumor com 1 cm e menos de 2 cm circunscrito a tiroide.	T1b
T2	Tumor com 2 cm e menos de 4 cm circunscrito a tiroide	T2
T3	Tumor com mais de 4 cm limitado a tiroide ou qualquer tumor com a mínima extensão extratiróidea (ex: extensão para o músculo esternotiroideu, tecidos moles peritiroideus.	T3
T4a	Doença em estadio moderado. Tumor de qualquer tamanho com extensão para além da tiróide. Invade os tecidos moles subcutâneos, laringe, traqueia, esófago ou o nervo recorrente laríngeo	T4a
T4b	Doença muito avançada O tumor invade fáscia prévertebral	T4b
N		
NX	Os nódos linfáticos não podem avaliados	MX
N0	Sem metástases linfáticas regionais	N0
N1	Metástases linfáticas regionais	N1
N1a	Metástases nível IV (pretraqueal, paratraqueal e prelaríngea/ gânglios linfáticos de Delfim.	N1a
N1b	Metástases unilaterais, bilaterais ou contracervicais (nível I, II, III, IV, ou V) ou retrofaríngeos ou nódos linfáticos mediastínicos superiores (VII)	N1b
M		
M0	Sem metástases	M0
	Metástases distantes	M1

O sistema de estadiamento tumoral TNM da AJCC complementado com o fator idade permite classificar os doentes em quatro grupos distintos de prognóstico (I – IV), sendo que o grupo IV corresponde a um pior prognóstico (Sipos & Mazzaferri, 2010) (Tabela 4).

Tabela 4 - Associação da classificação (TNM) ao grupo de prognóstico. Adaptado da AJCC 2010

Grupos de Prognostico			
Clinico / Patológico			
Carcinomas papilares e foliculares (menos de 45 anos)			
Grupo	T	N	M
I	Qualquer T	Qualquer N	M0
II	Qualquer T	Qualquer N	M1
Carcinomas papilares e foliculares (mais de 45 anos)			
Grupo	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
IV A	T3	N1a	M0
	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
IV B	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0
IV C	T4b	Qualquer N	M0
IV C	Qualquer T	Qualquer N	M1
Carcinoma medular (qualquer idade)			
Grupo	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
III	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
IV A	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4a	N1b	M0

IV B	T4b	Qualquer N	M0
IV C	Qualquer T	Qualquer N	M1
Carcinomas Anaplásticos (Estadio IV)			
Grupo	T	N	M
IV A	T4a	Qualquer N	M0
IV B	T4b	Qualquer N	M0
IV C	Qualquer T	Qualquer N	M1

Nos carcinomas foliculares da tiróide a sobrevivência a 5 anos nos estádios I e II é de aproximadamente 100%, no estágio III de 71 – 91% e no estadio IV é cerca de 50% (Mathur, Olson, & Zeiger, 2014).

1.1.1. Carcinomas Papilares

Os carcinomas papilares são os tumores da tiróide mais frequentes e ocorrem em cerca de 85% dos casos (Kumar & Kumar, 2010; Vu-Phan & Koenig, 2014). São constituídos por estruturas papilares com células neoplásicas em redor de um eixo fibroso. São tumores geralmente não funcionantes, que se apresentam como uma massa indolor no pescoço (Kumar & Kumar, 2010). Frequentemente apresentam focos de invasão linfática, sendo que a invasão dos vasos sanguíneos é relativamente rara, particularmente em lesões de menores dimensões (Kumar & Kumar, 2010). É um tumor que cresce de forma invasiva com limites irregulares (Thompson, 2012). Estima-se que as metástases ganglionares regionais ocorram em aproximadamente 40% dos doentes num estadio inicial (Y. Y. Jung et al., 2013). O diagnóstico de carcinoma papilar baseia-se nas características nucleares, mesmo na ausência de uma arquitetura papilar (Sobrinho-Simoes, Eloy, Magalhaes, Lobo, & Amaro, 2011). Os núcleos das células do carcinoma papilar são bem nítidos, contendo uma cromatina muito finamente dispersa, que lhe confere um tom opticamente claro, dando a designação de núcleos em “vidro despolido” ou “olhos de boneca”, associado a invaginações citoplasmáticas que podem ter o aspeto de inclusões intranucleares (pseudoinclusões) em cortes transversais (Kumar & Kumar, 2010; Thompson, 2012).

Macroscopicamente o carcinoma papilar apresenta-se como uma massa branco-cinza, com bordos irregulares e frequentemente circunscrito (Thompson, 2012) com calcificações que lhe dão um aspeto arenoso (Thompson, 2012).

Existem várias variantes de carcinomas papilares da tiróide, incluindo a variante clássica, folicular, de células altas e esclerosante difusa (Kumar & Kumar, 2010; Schlumberger & Pacini, 1997).

A ativação da via das proteínas-quinases activadas por mitogénios (MAPK) é representada a principal característica molecular dos carcinomas papilares e pode ocorrer através dois tipos de mecanismos (Schlumberger & Pacini, 1997). O primeiro, relaciona-se com os rearranjos cromossómicos no *RET* ou *NTRK1*. O RET é um recetor tirosina cinase da superfície das células que transmite sinais do ambiente peri-tumoral ao RAS, activando a via MAPK (Vu-Phan & Koenig, 2014). O RET normalmente não é expresso nas células foliculares normais da tiróide. Ontogeneticamente, o RET é essencial para o desenvolvimento do sistema nervoso simpático e parassimpático, neurónios entéricos, rins e células germinativas masculinas (Dellaire et al., 2014). Os rearranjos cromossómicos que envolvem o gene do *RET* ocorrem em aproximadamente 20% dos carcinomas papilares da tiróide. Estes rearranjos estão descritos como *RET/CPT* (*RET/CPT1*, *RET/CPT2*, etc.) que ativam constitutivamente o RET e consecutivamente a via sinalizadora MAPK (Cassol & Asa, 2010). A frequência destes rearranjos é maior em crianças que foram expostas a radiação ionizante (Vu-Phan & Koenig, 2014). Por sua vez, os rearranjos cromossómicos no *NTRK1*, outro recetor tirosina cinase, são encontrados em menos de 5% dos carcinomas papilares, (Omur & Baran, 2014; Vu-Phan & Koenig, 2014). O segundo mecanismo envolve mutações do *BRAF* que ativam a via MAPK (Vu-Phan & Koenig, 2014). O BRAF é um membro da família de proteínas RAF com funções serina/teonina na via da MAPK. A mutação mais conhecida é a V600E que resulta de uma substituição de um resíduo de uma valina por glutamato (Dellaire et al., 2014). Esta mutação ocorre com maior prevalência nas variantes clássica e de células altas dos carcinomas papilares da tiróide (Dellaire et al., 2014). Aproximadamente 1/3 dos doentes com carcinomas papilares da tiróide são portadores de mutações pontuais no oncogene *BRAF* (Omur & Baran, 2014; Vu-Phan & Koenig, 2014).

O carcinoma papilar afeta mais frequentemente as mulheres (4:1), entre os 20 – 40 anos, enquanto nos homens ocorre mais frequentemente entre os 40 – 60 anos (Tabela 5) (Thompson, 2012).

No dia 26 de Abril de 1986, com a explosão de um reator da central nuclear em Chernobyl na Ucrânia, sucedeu-se a fuga de radiação ionizante para a atmosfera (10^{19} Bq) que se prolongou por mais de 1 semana e se disseminou um pouco por toda a Rússia, estados vizinhos e Europa Ocidental (Williams, 2008). Os gases radioativos e os isótopos voláteis que foram libertados para a atmosfera (cerca $1,7 \times 10^{18}$ becquerel (Bq)¹ de I^{131} e grandes quantidades de Te^{132} que decaíram para I^{132}) foram responsáveis por efeitos nefastos que só se tornaram perceptíveis passados 4 anos (1990), quando foi observado um aumento do número de cancro da tiróide, particularmente em crianças (Williams, 2008). A tiróide, pela sua capacidade de captar e concentrar o iodo, recebeu desta forma 500-1000 vezes mais radiação que o resto do organismo (Williams, 2008).

Em 2006 a Organização Mundial da Saúde, 20 anos após o acidente de Chernobyl, concluiu que 4000 casos de cancro da tiróide foram causados pela exposição a partículas radioativas libertadas pela explosão em Chernobyl (Williams, 2008). Os primeiros casos de cancro da tiróide em crianças foram identificados em Chernobyl, sendo todos carcinomas papilares (LiVolsi et al., 2011), seguidos dos casos identificados nos primeiros anos nas regiões da URSS mais próximas, em que 98% dos casos identificados na Bielorrússia e 94% dos casos identificados na Ucrânia, foram carcinomas papilares da tiróide (Williams, 2008).

Tabela 5 - Características clínicas dos carcinomas papilares. Adaptado de Thompson, 2012 e Nikiforov & Nikiforova, 2011.

Carcinoma Papilar
Incidência e Localização
~ 85 % dos casos de neoplasias da tiróide
Sexo e Distribuição de Idade
- Mulheres >> Homem (4:1)

¹ A atividade dos radionuclédeos é representada pela taxa do decaimento radioativo e é medida em Bq (*Becquerel*), onde 1 Bq corresponde a uma desintegração nuclear por segundo (Wakeford, 2004).

- Idade: 20 – 60 anos.

Frequência de formas familiares

- 5 %

Características Clínicas

- Associado a exposição a radiação
- Normalmente apresenta-se como uma massa palpável, frequentemente com gânglios linfáticos no pescoço.
- Invulgarmente apresenta disfagia e rouquidão.

Sobrevivência a 10 anos

- 95 – 98 %

1.1.1.1. Variante Clássica

Variante clássica dos tumores da tiróide é caracterizada por apresentar uma arquitetura papilar, estruturas concêntricas calcificadas denominadas de corpos de psamoma que surgem com frequência no interior das papilas, pseudoinclusões, com núcleos em forma de “olhos de boneca” (Kumar & Kumar, 2010).

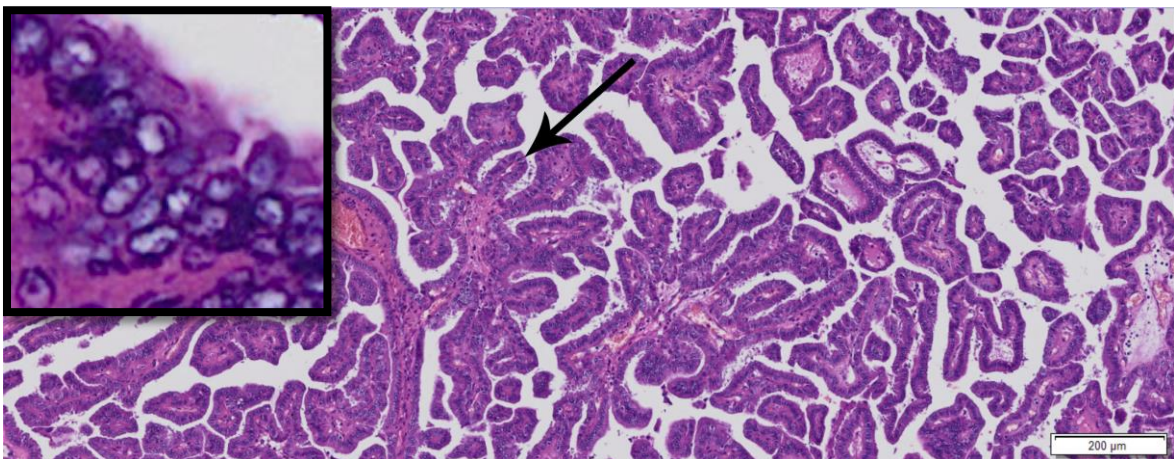


Figura 3 - Imagem histológica de um carcinoma papilar, variante clássica. Seta: Complexo papilar. Células apresentando uma desorganização nuclear, aglomeração e sobreposição nuclear. (coloração HE, ampliação 80x)

1.1.1.2. Variante Folicular

A variante folicular dos tumores da tiróide é caracterizada por não apresentar estruturas papilares, mas contendo folículos e conservar as características nucleares dos carcinomas papilares, que a distingue dos carcinomas foliculares da tiróide, surgindo geralmente não capsulado (Thompson, 2012). Os carcinomas papilares da variante folicular, partilham características tanto dos carcinomas papilares como dos carcinomas foliculares (Eloy, Santos, Soares, & Sobrinho-Simoes, 2011). Desde 2002, que M. Sobrinho-Simões *et al* tem vindo a constatar a existência de 3 subtipos de carcinomas papilares variante folicular, os carcinomas pouco circunscritos/ infiltrativos que metastizam como os carcinomas papilares clássicos para os gânglios linfáticos, os capsulados que habitualmente não metastizam e finalmente os multinodulares/difusos que são caracterizados por apresentarem frequentemente metástases envolvendo o osso

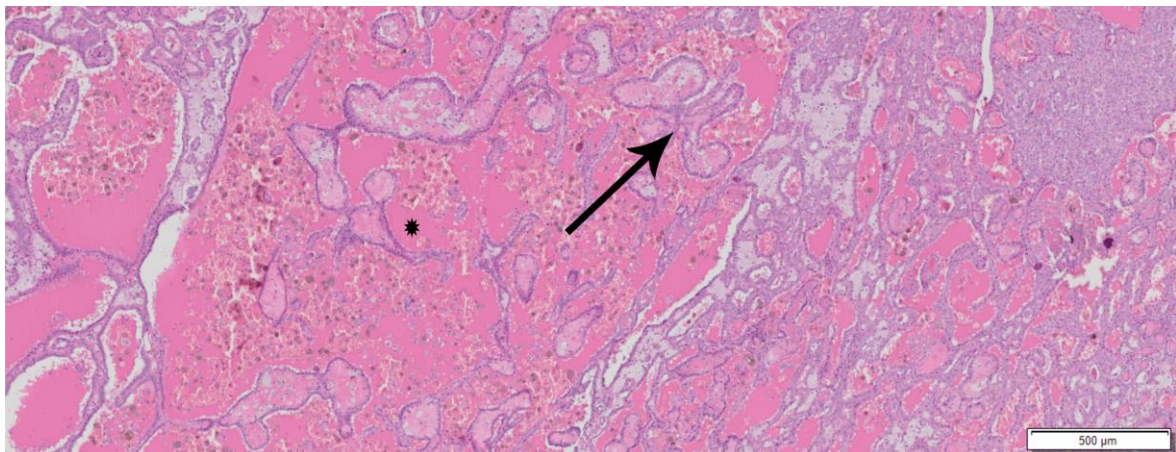


Figura 4 – Imagem histológica de um carcinoma papilar variante folicular. Asterisco: Colóide hípereosinófilo. Seta: Estrutura folicular (coloração HE, ampliação 20x).

e pulmão e sempre com gânglios linfáticos invadidos.

A incidência desta variante é difícil de determinar, pois no passado algumas destas neoplasias foram classificadas como carcinomas foliculares ou adenomas foliculares (LiVolsi, 2011).

Os tumores papilares da variante folicular apresentam uma baixa frequência de rearranjos cromossômicos *RET/PTC*, mas uma maior frequência de mutações no *RAS*. Nestes tumores ocorrem também translocações no *PAX8* e

PPARG (Vu-Phan & Koenig, 2014). O tratamento e seguimento dos doentes é idêntico ao do carcinoma papilar variante clássica (Thompson, 2012).

1.1.1.3. Variante de Células Altas

O carcinoma papilar da variante células altas é relativamente raro e é marcado pela presença de células cilíndricas altas, ou seja, com pelo menos o dobro do tamanho normal das células e com uma intensa eosinofilia citoplasmática, sendo revestidas por estruturas papilares (Kumar & Kumar, 2010; Thompson, 2012). Esta variante exhibe mutações em cerca de 55 – 100% dos casos e frequentemente apresenta translocações do *RET/PTC*. Estes carcinomas tendem a ser mais agressivos (Kumar & Kumar, 2010), e o seu prognóstico é pior do que o carcinoma papilar variante clássica (Thompson, 2012).

1.1.1.4. Variante esclerosante difusa

A variante esclerosante difusa dos carcinomas papilares é menos comum, ocorre mais frequentemente em jovens e crianças (Thompson, 2012) e representa cerca de 3% de todas as neoplasias da tiróide (LiVolsi, 2011). O tumor apresenta-se com papilas proeminentes por vezes com áreas sólidas contendo “ninhos” de metaplasia escamosa (Kumar & Kumar, 2010). Quase 100% dos doentes exibem metástases para os gânglios linfáticos cervicais aquando do diagnóstico (Thompson, 2012). Em mais de 25% dos doentes ocorrem metástases para o pulmão, pelo que é necessário um *follow-up* apertado (Thompson, 2012).

1.1.2. Carcinomas Foliculares

Os carcinomas foliculares são a segunda forma mais comum de cancro da tiróide, representando 5% a 15 % dos tumores primários da tiróide e ocorrendo em idades mais avançadas do que a dos carcinomas papilares (Kumar & Kumar, 2010; Thompson, 2012). A morfologia dos carcinomas foliculares é semelhante à do tecido normal, sendo composta por células bastante uniformes e constituindo pequenos folículos (Kumar & Kumar, 2010). Os carcinomas podem ser

macroscopicamente infiltrativos ou minimamente invasivos. O diagnóstico faz-se pela presença de invasão do parênquima tiroideu (Kumar & Kumar, 2010). Os tumores podem apresentar-se como nódulos solitários, geralmente capsulados e um tamanho inferior a 5 cm (Thompson, 2012). Pensa-se que os carcinomas foliculares poderão evoluir do adenoma folicular da tiróide (Thompson, 2012) e exibem características microscópicas típicas, como a invasão da cápsula e invasão vascular (Dellaire et al., 2014). Em alguns casos, raros, os nódulos podem ser hiperfuncionantes, mas geralmente os testes da função da tiróide são normais (Thompson, 2012). Estas neoplasias tendem a metastizar através da corrente sanguínea para os pulmões, ossos e fígado, ao contrário as metástases por via linfática, que são extremamente raras (Kumar & Kumar, 2010). Sendo que mais de 20% dos doentes apresentam metástases à distância para o pulmão e osso (Thompson, 2012) (Tabela 6).

O carcinoma folicular desenvolve-se mais frequentemente nas regiões geográficas onde existe carência de iodo (Dellaire et al., 2014). Quando a invasão da cápsula e/ou vascular é intensa o prognóstico é globalmente pior que o dos carcinomas papilares, mas os doentes com invasão mínima têm um excelente prognóstico (Dellaire et al., 2014).

Nos carcinomas foliculares estão descritas mutações nas 3 famílias do gene *RAS*. Sendo que foram identificadas mais de 50% de mutações no *RAS* nos carcinomas foliculares, 40% no adenomas foliculares e 25% na variante oncócica, com frequência relativa *NRAS* > *HRAS* > *KRAS* respetivamente (Dellaire et al., 2014).

A fusão do *PAX8-PPARY1* é observada em alguns carcinomas foliculares e resulta da translocação t(2,3) q(13; p25). *In vitro*, a fusão promove o crescimento celular, diminui a apoptose e promove a formação de colónias em culturas, o que por si só, é suficiente para promover a tumorigénese na tiróide (Cassol & Asa, 2010). Esta fusão é observada em cerca de 30-35% dos casos de carcinomas foliculares e em cerca de 2-13% dos adenomas foliculares (Dellaire et al., 2014).

Tabela 6 - Características clínicas dos carcinomas foliculares. Adaptado de Thompson, 2012 e Nikiforov & Nikiforova, 2011.

Carcinoma Folicular
Incidência e Localização ~ 10 -15 % dos casos de neoplasias da tiróide Surge mais frequentemente onde existe deficiência de iodo ou em associação às síndromes de Cowden, Werner ou Carney.
Sexo e Distribuição de Idade - Mulheres > Homem (2:1) - Idade: frequentemente na 5ª e 6ª década.
Frequência de formas familiares - 5%
Características Clínicas - Frequentemente assintomático, massa palpável. - Raramente disfagia e rouquidão.
Sobrevivência a 10 anos - 90 – 95%

1.1.2.1. Variante Clássica

A variante clássica do carcinoma folicular caracteriza-se por apresentar nódulos bem circunscritos ou infiltrativos, sendo que nas lesões bem demarcadas se torna difícil de distinguir dos adenomas foliculares. Na maior parte dos casos os carcinomas foliculares são compostos por células bastante uniformes formando folículos contendo colóide muito parecido com a tiróide normal. Em alguns casos a diferenciação folicular é menos evidente apresentando “ninhos” ou “folhas” sem colóide.

1.1.2.2. Variante Oncócítica (Tumor de Células de Hürthle)

A variante oncócítica dos carcinomas foliculares é composta por 75% ou mais de células de Hürthle, que se caracterizam por apresentarem um citoplasma eosinófilo com abundantes grânulos (Dellaire et al., 2014). Os tumores oncocíticos

apresentam em 30% dos casos metástases para os gânglios linfáticos cervicais (Dellaire et al., 2014).

1.1.3. Carcinomas Medulares

Os carcinomas medulares têm uma origem diferente dos carcinomas papilares e foliculares, uma vez que derivam das células parafoliculares ou células C da tiróide. Cerca de 80% dos casos são esporádicas (Kumar & Kumar, 2010) e os restantes são formas familiares isoladas ou no contexto de síndromes, tais como, a neoplasia endócrina múltipla NEM-2A ou 2B (Dellaire et al., 2014; Kumar & Kumar, 2010).

A localização típica do carcinoma medular é no terço médio dos lobos, podendo ser unilateral, no casos das formas espontâneas, ou múltiplos e bilaterais, nos casos familiares do carcinoma medular (Dellaire et al., 2014).

Tanto as formas espontâneas como familiares envolvem mutações ativadoras no *RET* (Dellaire et al., 2014) estando mutadas na linha germinativa de quase todos os casos familiares de carcinomas medulares e somaticamente em 30-50% dos casos esporádicos. Os carcinomas medulares secretam calcitonina, cujo doseamento desempenha um papel importante no seu diagnóstico e prognóstico. Em alguns casos mais raros as células tumorais secregam hormonas polipeptídicas como a somatostatina, serotonina e o peptídeo intestinal vasoativo

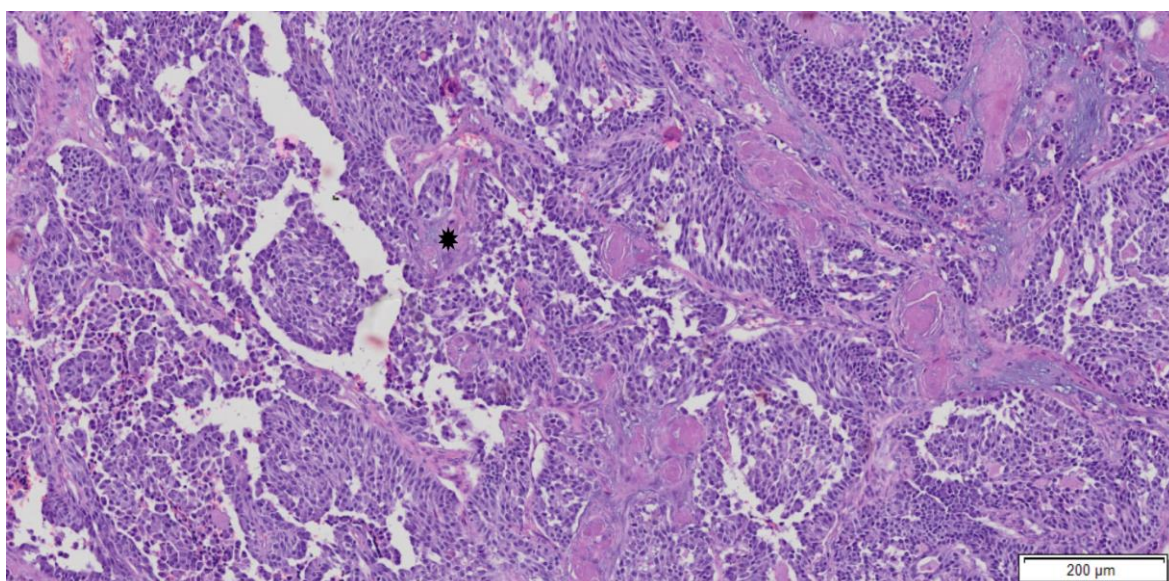


Figura 5 - Imagem histológica de um carcinoma medular, demonstrando um crescimento destrutivo e pleomorfismo nuclear. Asterisco: Amilóide (coloração HE, ampliação 80x)

(Cassol & Asa, 2010; Kumar & Kumar, 2010).

Histologicamente, os carcinomas medulares são compostos por células que variam de poligonais a fusiformes, podendo formar “ninhos”, trabéculas e até mesmo folículos. No estroma adjacente podem-se encontrar depósitos amilóides oriundos das moléculas alteradas de calcitonina. Nos casos familiares pode existir hiperplasia multicêntrica de células C no parênquima tiroideu e uma multicentricidade das células neoplásicas.

Tabela 7 - Características clínicas dos carcinomas medulares. Adaptado de Thompson, 2012 e Nikiforov & Nikiforova, 2011.

Carcinoma Medular

Incidência e Localização

- ~ 5 - 8% dos casos de neoplasias da tireóide
 - 80% esporádicos; 20% familiares
- Geralmente desenvolve-se na porção média e superior dos lobos da tireóide

Sexo e Distribuição de Idade

- Mulheres > Homem (1.1:1)
- Idade: frequentemente na 5ª e 6ª década nos casos esporádicos e na 3ª década nos casos familiares

Morbilidade e Mortalidade

- Outras doenças associadas com a doença familiar (MEN – Neoplasias Múltiplas Endócrinas)
- ~ 50% aos 5 anos dependendo do estadió e da doença familiar.

Frequência de formas familiares

- 15 – 30%

Características Clínicas

Os casos esporádicos apresentam nódulos unilaterais e solitários.
Casos familiares apresentam focos tiroideus multicêntricos e bilaterais.
Existe frequentemente metastização ganglionar (~50% dos casos).
Níveis de calcitonina elevados nos casos esporádicos e familiares.

Sobrevivência a 10 anos

60 – 80 %

1.1.4. Carcinomas Anaplásicos

Os carcinomas anaplásicos da tiróide são os tumores da tiróide mais agressivos, pois apresentam um crescimento muito rápido e é muito comum ocorrerem metástases (Kumar & Kumar, 2010). Cerca de 50% dos indivíduos com carcinomas anaplásicos apresentam antecedentes de bócio multinodular, pelo que se suspeita que o carcinoma anaplásico resulte da “desdiferenciação” de tumores mais diferenciados como resultado de uma ou mais alterações genéticas, incluindo a perda da função do gene p53 (Kumar & Kumar, 2010).

Histologicamente, o carcinoma anaplásico é constituído por células altamente indiferenciadas, que podem apresentar diversas formas incluindo células gigantes e pleomórficas, células fusiformes com aspeto sarcomatoso, lesões mistas de células gigantes e fusiformes e células pequenas semelhantes às observadas nos carcinomas de pequenas células em outros locais (Kumar & Kumar, 2010).

1.2. Metástases tumorais

Do grego “*metástasis*” que significa mudança de lugar. As metástases referem-se a disseminação do cancro, a partir de um foco principal, sendo que estas constituem a principal causa de morte em doentes com cancro (Stacker et al., 2014). A disseminação de células oriundas do tumor primário para sítios à distância não é um processo aleatório, pois diferentes tipos de cancros podem originar metástases em diferentes destinos. Existem duas teorias explicativas para justificar o padrão de metastização associado às diferentes neoplasias, sendo que a primeira propõe explicar as diferenças baseada na produção de diferentes agentes quimiotáticos pelos diferentes órgãos, sendo específicos para determinado tipo de células cancerígenas (Stetler-Stevenson and Kleiner, 2001), enquanto a segunda teoria baseia-se nas diferentes condições de crescimento para determinados tipos de células neoplásicas proporcionadas pelos diferentes órgãos (Paget, 1889). No entanto, para que a metastização ocorra é necessário que as células neoplásicas encontrem uma via de transporte para se

disseminarem pelo organismo, sendo que existem duas vias alternativas, a via sanguínea e a via linfática (A. Christiansen & M. Detmar, 2011)

1.3. Linfoangiogênese como fator para a ocorrência de metastização.

O termo linfoangiogênese que do latim “*lympa*” que significa água, do grego “*angeion*” que significa vaso e do grego “*gennân*” que significa produzir, traduz a formação de vasos linfáticos a partir de vasos pré-existentes.

Os vasos linfáticos eram classicamente considerados participantes passivos no desenvolvimento de metástases tumorais (Ailsa Christiansen & Michael Detmar, 2011), baseado na existência aleatória de vasos linfáticos nas proximidades do tumor.

A angiogênese e a linfoangiogênese apenas ocorrem quando são libertados fatores que as promovem (Albrecht & Christofori, 2011). A angiogênese

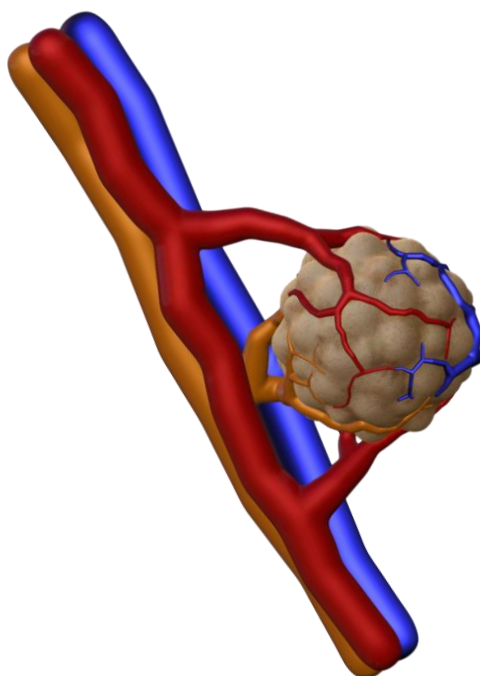


Figura 6 – Ilustração demonstrando a angiogênese e a linfoangiogênese tumoral. A amarelo estão representados os vasos linfáticos, a azul as veias e vénulas e a vermelho as artérias e arteríolas.

vai favorecer o crescimento e desenvolvimento do tumor, ao nutri-lo enquanto a

linfoangiogénese irá favorecer a sua disseminação por via linfática, metastizando para outros locais.

O sistema linfático é um sistema altamente especializado que faz parte do sistema vascular e tem uma grande importância no sistema imune, manutenção da pressão sanguínea e absorção da gordura da dieta (Tammela and Alito, 2010). A ausência de vasos linfáticos é incompatível com a vida. Os vasos linfáticos foram inicialmente descritos pelo cirurgião milanês Gaspare Aselli em 1622, como sendo constituídos por um epitélio simples gerando “condutas” dos tecidos periféricos para a corrente sanguínea, não revestidos por pericitos ou músculo liso, podendo ter ou não uma membrana basal e que posteriormente se demonstrou apresentar padrões distintos de expressão génica (Atilano *et al*, 2005; Mayby-El Hajjami and Petrova, 2008; Wick *et al*, 2007).

A linfoangiogénese é o processo pelo qual se formam novos vasos linfáticos a partir dos vasos pré-existentes na presença de sinalizadores moleculares como o VEGF-C, o recetor hialurano endotelial dos vasos linfáticos (LYVE-1) e o fator de transcrição prospero 1 (Prox-1) (Moreira *et al* 2013). Nos indivíduos adultos, a linfoangiogénese apenas ocorre durante o processo inflamatório, cicatrização das feridas e processos tumorais (Alitalo and Detmar, 2012).

Nos carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço e nos carcinomas orofaríngeos foi documentada a presença de vasos linfáticos intratumorais cuja densidade demonstrou estar correlacionada com a presença de metástases para os gânglios linfáticos loco regionais utilizando como marcador o antigénio LYVE-1 (Jackson *et al* 2001), sugerindo que o número e o tamanho dos vasos linfáticos no tumor ou peritumorais possam ser um fator importante para a metastização ganglionar.

Há cada vez mais evidências de que a indução da linfoangiogénese é controlada por inúmeras interações, entre as células tumorais, células do sistema imune, células endoteliais e componentes da matriz extracelular, que secretam uma variada gama de moléculas entre as quais quimiocinas, citoquinas e fatores de crescimento. No caso particular das células endoteliais linfáticas foi demonstrado que secretam CCL21 (Shields *et al*, 2007; Massi and Gokoz, 2010).

Sendo que as células tumorais que expressam o recetor da CCL21, o CCR7, migram no sentido quimiotático para as células endoteliais linfáticas produtoras de CCL21 (Massi & Gokoz, 2010).

Estudos recentes demonstraram que o óxido nítrico (NO) é produzido e libertado pelas células linfáticas endoteliais, possivelmente regulando a permeabilidade dos vasos (Da, Wu, & Tian, 2008; Massi & Gokoz, 2010). A estimulação da atividade do NO induzível (iNO) nos tumores está relacionada com a expressão de fatores linfoangiogénicos como o VEGF-C e o VEGF-D (Massi & Gokoz, 2010). Nos melanomas a densidade linfática intratumoral e peritumoral foi correlacionada com a atividade do iNO, o que conduziu à elaboração da hipótese que a atividade do iNO possa ser responsável pelo aumento do número de vasos linfáticos e estimulação da linfoangiogénese no melanoma (Massi & Gokoz, 2010).

Nos cancros da mama, estômago, vesícula biliar e da cabeça e pescoço, nomeadamente em tumores da tiróide, também foi demonstrada a existência de uma correlação positiva entre a expressão/atividade do NO nos tecidos tumorais e a existência de metastização linfática (Massi & Gokoz, 2010). Pelo contrário, o bloqueio da sinalização do NO pela guanilato ciclase demonstrou comprometer a proliferação linfática em modelos *in vivo* induzida pela radiação ultravioleta B, o que sugere que a via de sinalização do NO medeia a linfoangiogénese (Massi & Gokoz, 2010).

1.4. Linfoangiogénese na tiróide.

Os carcinomas papilares e foliculares da tiróide embora tenham origem na mesma célula folicular disseminam-se tendencialmente por vias vasculares diferentes. Os carcinomas papilares (> 85% dos casos) metastizam preferencialmente por via linfática (Giorgadze, Baloch, Pasha, Zhang, & Livolsi, 2005; Hall, Freeman, Asa, Jackson, & Beasley, 2003), enquanto os carcinomas foliculares (5 -15% dos casos) metastizam preferencialmente por via hematogénica (Giorgadze et al., 2005; Kumar & Kumar, 2010).

Os carcinomas papilares tendem a metastizar para os gânglios linfáticos cervicais durante estádios iniciais da doença, sendo as metástases para os gânglios linfáticos cervicais encontradas em 30-90% dos doentes a quando do diagnóstico (C. K. Jung et al., 2010). A presença de metástases ganglionares aumenta o risco de recorrência locoregional, de mortalidade em doentes com mais de 45 anos e de desenvolvimento de metástases à distância (C. K. Jung et al., 2010).

Foi demonstrado que a expressão do VEGF-D, relacionada com o aumento da densidade linfática, tem um papel importante na linfoangiogénese no carcinoma papilar da tiroide (Yasuoka et al., 2005). A expressão do VEGF-C também está aumentada nos carcinomas papilares, e associada a metástases linfáticas (de la Torre, Buley, Wass, & Turner, 2006; Yu et al., 2005).

A expressão de fatores linfoangiogénicos (VEGF-C e VEGF-D) surge aumentada nos carcinomas papilares da tiróide em comparação com o parênquima não tumoral, doravante denominado de tecido tiroideu normal (de la Torre et al., 2006; Garcia et al., 2010; Yu et al., 2005), lesões benignas (de la Torre et al., 2006; Garcia et al., 2010; Yu et al., 2005) e com os carcinomas foliculares da tiróide (Fellmer et al., 1999). Este aumento de expressão de fatores linfoangiogénicos está relacionada com o aumento da densidade linfática intratumoral e peritumoral (Garcia et al., 2010; Yasuoka et al., 2005; Yu et al., 2005).

A densidade peritumoral é semelhante nos 3 subgrupos do carcinoma papilar da tiróide (variante clássica, variante folicular infiltrativa e variante capsulada) (Eloy et al., 2011). Contudo, os vasos linfáticos intratumorais parecem estar correlacionados com a extensão extra-tiroideia, invasão dos vasos linfáticos e metástases para os gânglios linfáticos nos carcinomas papilares da tiróide (Eloy et al., 2011; Hall et al., 2003)

1.4.1. Marcadores linfáticos.

As células do endotélio linfático são distintas, das células endoteliais dos vasos sanguíneos, o que permitiu a descoberta de moléculas específicas que podem ser usadas para identificação dos vasos linfáticos, tais como o D2-40, Prox-1, LYVE-1 e VEGFR3, com funções biológicas e padrões de expressão distintos, cujas características gerais se descrevem na Tabela 8 (Massi & Gokoz, 2010).

Tabela 8 - Tabela dos principais marcadores linfáticos. Adaptado de (Massi & Gokoz, 2010)

Marcador Linfático	Tipo molecular	Locais de expressão	Atividade Biológica
D2-40 Podoplanina	Mucoproteína do podócito glomerular.	Co-expresso com o VEGFR-3 nos vasos linfáticos, tumores vasculares, osteoblastos, células alveolares pulmonares do tipo I.	Manutenção da permeabilidade lamelar e da forma do podócito.
Prox1	Fator de transcrição.	Células não endoteliais do cristalino, coração, fígado, pâncreas e sistema nervoso.	Desenvolvimento e diferenciação dos vasos linfáticos.
LYVE-1	Recetor 1 do Ácido hialurónico 1.	Endotélio sinusoidal no fígado e intestino, rim, pâncreas, adrenais, sinciotrofoblastos placentários.	Transporte do ácido hialurónico da matriz extracelular para gânglios linfáticos.
VEGFR-3	Recetor tirosina quinase, recetor do fator de crescimento.	Principalmente nos vasos linfáticos, tumores dos vasos sanguíneos, vasos sanguíneos altamente fenestrados e macrófagos.	Recetor do VEGF-C e do VEGF-D, sinaliza a linfangiogénese.

Em particular o marcador molecular D2-40, também chamado podoplanina, é uma sialoglicoproteína expressa pelo endotélio linfático, que pela sua especificidade constitui um bom marcador para identificar os vasos linfáticos nos tecidos tiroideus.

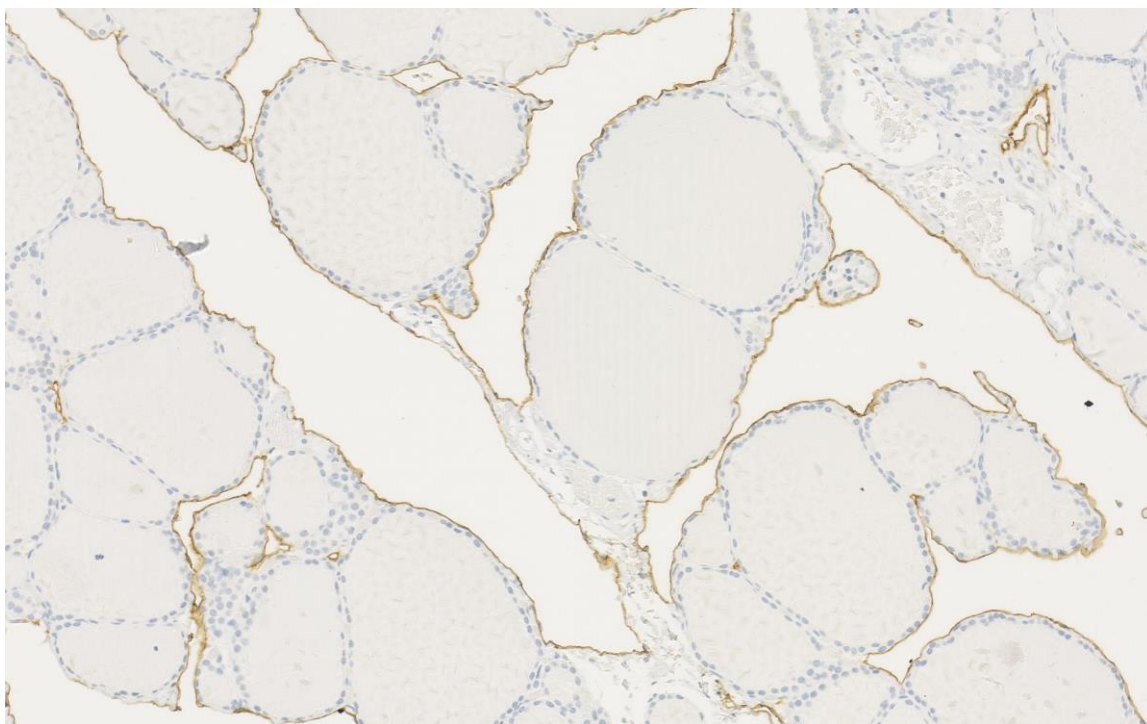


Figura 7 - Fotografia de Imunohistoquímica para o D2-40, evidenciando os vasos linfáticos (castanho) com contrastação nuclear a hematoxilina (azul) no tecido tiroideu normal (Imunohistoquímica D2-40, ampliação 200x)

2. Objetivo

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a densidade vascular linfática intra e peritumoral nos tumores da tiróide (carcinomas papilares variante clássica, carcinomas papilares variante folicular e carcinomas medulares), no sentido de avaliar o papel destes vasos como um fator preditivo de disseminação tumoral a nível ganglionar.

3. Material e Métodos

3.1. Seleção de Doentes

Os doentes incluídos no presente estudo foram provenientes da consulta de Tumores da Tiroideia, do Instituto Português de Oncologia de Lisboa, tendo sido selecionados doentes que apresentavam carcinomas papilares da variante clássica (n = 29), carcinomas papilares da variante folicular (n = 20) e carcinomas medulares da tiróide (n= 42). Para cada caso procedeu-se ao levantamento dos dados anatomopatológicos, tais como género do doente, diâmetro do tumor, tipo histológico e variante tumoral, presença de extensão extra-tiroideia, estadiamento e idade do doente à data do diagnóstico.

3.2. Coloração de Hematoxilina-Eosina

Após a seleção dos blocos de parafina foram realizados de cortes de 4µm, para lâminas convencionais, procedeu-se à desparafinação em xilol e re-hidratação utilizando uma série decrescente de álcoois (100, 95, 70%) até à água, seguida da coloração com hematoxilina (Merck, ref.: XR390929, Alemanha) durante 3 minutos e lavagem em água corrente durante 15 minutos. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em eosina Y aquosa (Thermo Scientific, ref.: 6766010, Reino Unido) durante 3 minutos seguida de uma rápida desidratação numa série crescente de álcoois (70, 95 e 100%), diafanização em xilol e montagem em Entellan.

3.3. Imunohistoquímica pelo D2-40

Após realização de cortes de 3µm para lâminas adesivadas StarFrost (Knittel Glass, Alemanha), procedeu-se à sua desparafinação em xilol e re-hidratação utilizando álcoois de graduação decrescente (100, 95, 70 %) até à água. A recuperação antigénica foi realizada pela exposição ao micro-ondas a 900W durante 20 minutos em tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com Tween 20 a 0.05% Após o arrefecimento os cortes foram lavados 2 vezes em PBS (pH 7.4) com Tween 20 a 0.05% (PBS-T). Seguida do bloqueio da peroxidase endógena

recorrendo a uma solução de peróxido de hidrogénio a 3% (Merck, ref.: K44653709338, Alemanha) em metanol (Merck, Alemanha) durante 15 minutos seguida de 2 lavagens em PBS-T.

Posteriormente as lâminas foram montadas no aparelho “Sequenza Immunostaining Center” (Thermo Scientific Shandon) onde se procedeu a uma lavagem adicional com PBS-T. A incubação com anticorpo primário anti-D2-40 (Dako, ref.: M3619, U.S.A.) na diluição 1:200 em diluente de anticorpos (Dako, ref.: S0809, U.S.A.) durante 60 minutos à temperatura ambiente. Seguida de 3 lavagens durante 5 minutos com PBS-T, após o que os cortes foram incubados com a solução A (HRP Rabbit/Mouse) do Kit Dako REAL Vision (Dako, ref.: K5007, Dinamarca) durante 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de 2 lavagens em PBS-T.

A revelação da ligação imune foi realizada utilizando o substrato DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) deixado atuar durante 6 minutos. Para tal, preparou-se a solução de trabalho juntando a solução B (Substrate Buffer) com a solução C (DAB + Chromogen) do Kit Dako REAL Vision (Dako, ref.: K5007, Dinamarca) na proporção de 1mL para 20 μ L. A revelação foi terminada com lavagem em água e procedeu-se à contrastação nuclear com a Hematoxilina de Mayer’s (Merck, ref.: HX390929, Alemanha – diluição 1:10 em água destilada) seguida de uma contrastação regressiva durante 10 minutos em água corrente. Finalmente as lâminas foram desidratadas numa graduação crescente de álcoois (70, 95, 100%), seguida de diafanização em xilol e montagem em Entellan para observação por microscopia ótica.

Como controlo negativo interno foi usada uma lâmina sem incubação com o anticorpo primário, sendo este substituído pelo diluente de anticorpos (Dako, ref.: S0809, U.S.A.).

Usou-se também um controlo positivo que foi interno através de uma marcação positiva dos vasos linfáticos e negativa dos vasos sanguíneos.

3.3.1. Aquisição das imagens

Todas as lâminas foram digitalizadas no aparelho Olympus VS110 e capturadas com uma ampliação de 20 vezes recorrendo ao *software* de aquisição de imagens para Windows VS-ASW versão 2.3.

3.3.2. Processamento e análise das imagens obtidas

As imagens obtidas foram preparadas para análise após serem redimensionadas recorrendo ao programa Cellsens Dimension (Olympus) versão 1.11 para Windows. As imagens foram reduzidas para 75% do seu tamanho original e guardadas em formato TIFF.

As imagens das lâminas coradas com hematoxilina-eosina foram observadas pelo mesmo Patologista, sem acesso a qualquer outra informação de natureza clínica, que delimitou a área tumoral com base em critérios unicamente morfológicos.

Após transcrição dos limites tumorais para as imagens das lâminas marcadas para o D2-40 por imunohistoquímica, estas foram analisadas recorrendo ao *software* de processamento de imagens Fiji (Fiji is Just Image J) em formato Java, desenvolvido pelo U. S. National Institutes of Health (NIH) e obtido em: www.fiji.sc/Fiji, versão Life-Line de 2 de Junho de 2014 para Macintosh.

Antes de proceder à análise das imagens, estas foram submetidas a verificação e correção manual, tendo sido retirados os artefactos resultantes da impregnação com tinta-da-china (cor preta), os focos de tiroidite nos casos em que estava presente e as zonas de sobreposição de tecido originados devido a descolamentos dos cortes.

Para cada imagem, foi delimitada a área tumoral e toda a área tecidular (tecido normal e tumoral) recorrendo aos cortes corados com pela coloração HE recorrendo à ferramenta ROI Manager do Fiji. Após delimitação da área tumoral, delimitou-se a região peritumoral 1, correspondendo a uma distância do perímetro tumoral de 250 *pixels*, que constitui o *offset1*. A partir deste limite estabeleceram-

se duas novas regiões peritumorais (*offset 2* e *offset 3*), sendo que para cada uma a delimitação foi efetuada com base na anterior recorrendo à mesma distância, obtendo-se desta forma a 3 zonas peritumorais correspondentes aos 3 *offset's* como se pode observar na figura 8.

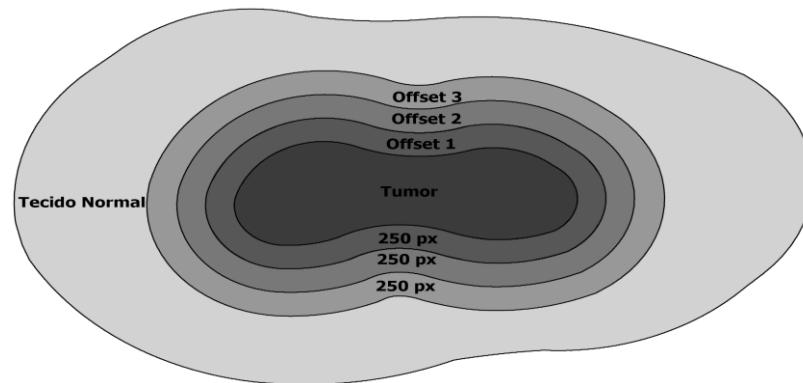


Figura 8 - Ilustração das áreas de tecido tumoral, peritumoral (*offset's*) e tecido normal.

Após a seleção das áreas de interesse utilizou-se o *Color Deconvolution*, para decompor a imagem recorrendo ao sistema RGB (Red, Green, Blue) que permite obter 3 imagens distintas (Figura 9)

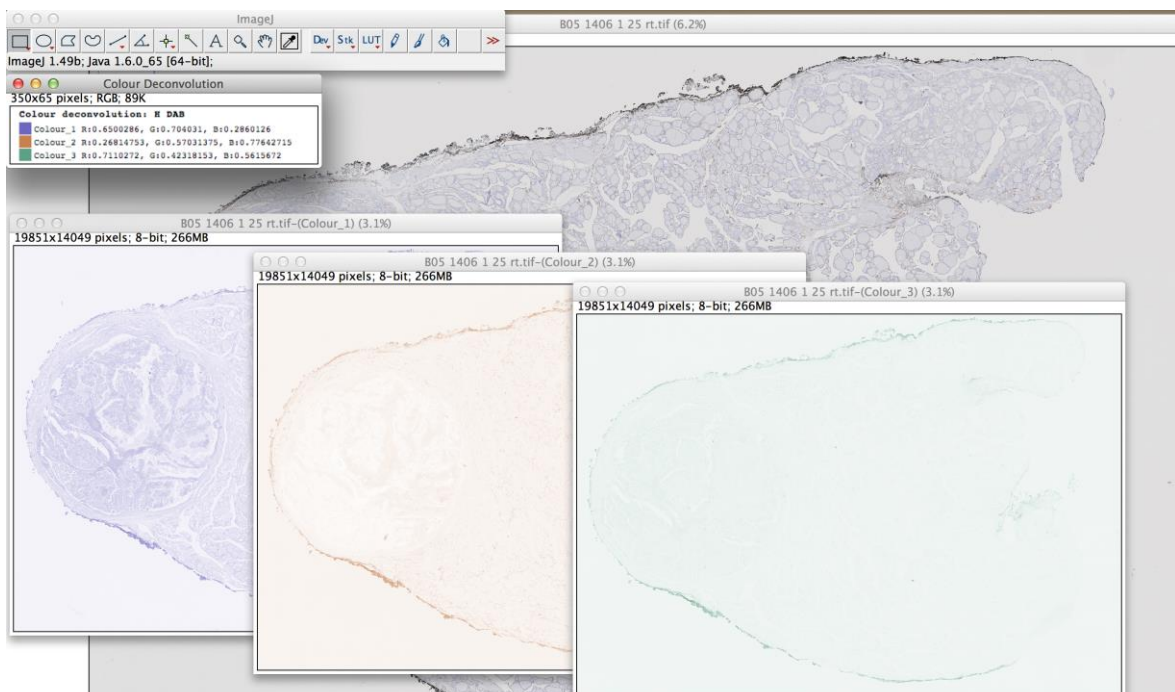


Figura 9 - Ilustração da decomposição de uma imagem RGB (Red, Green, Blue)

Para tal, no presente estudo foi utilizada a opção do “*Color Deconvolution*” – H DAB que isola a marcação pelo DAB, a marcação de interesse de cor castanha, da coloração pela hematoxilina, tendo sido seleccionada a imagem “*colour 2*” da figura 9 (Figura 9).

Após seleccionar a área de interesse ou “*region of interest*” (ROI) recorrendo ao ROI Manager, utilizou-se o comando “*threshold*”, que permite transformar a imagem numa imagem binária a preto e branco. Posteriormente, utilizou-se a opção “*Set measurement*” para seleccionar o parâmetro “*Area fraction*” e por fim o comando “*Analyze particles*”, que permite apresentar os resultados em percentagem de área marcada na imagem. Este processo foi realizado para cada área de interesse de modo a obter a percentagem de área marcada em cada imagem (Figura 10).

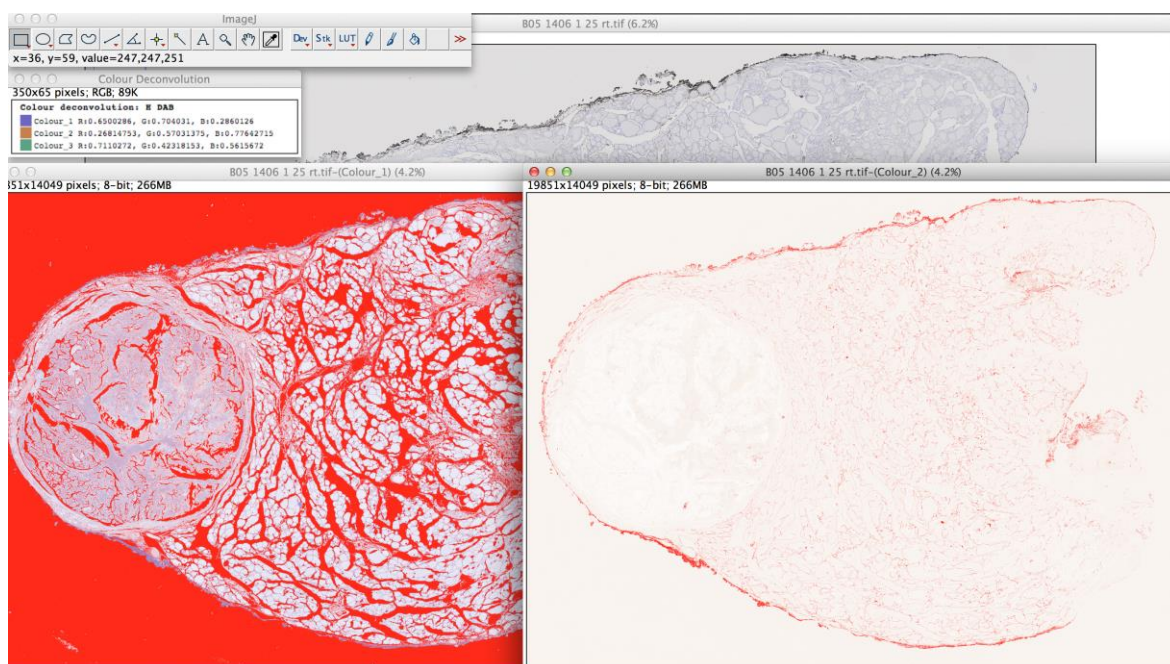


Figura 10 - Ilustração do *Threshold* para os brancos e para a marcação imunohistoquímica pelo D2-40

A área tecidual foi quantificada utilizando o mesmo procedimento, mas invertendo o “*threshold*” para quantificar a área em branco, na imagem “*colour 1*” (Figura 10).

Para as lâminas que continham mais do que um fragmento de tecido foi realizado o somatório das áreas para obtenção da área tecidual total e calculada a média para os diferentes parâmetros analisados.

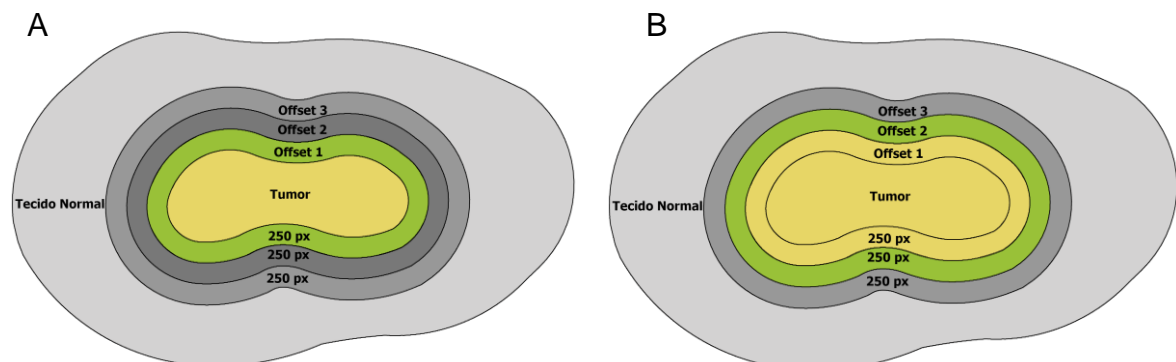
Posteriormente, procedeu-se a um novo cálculo para subtrair as áreas brancas da imagem da área do tecido total obtida anteriormente, o que permitiu calcular a área tecidual, sem as áreas brancas:

$$\text{área total do tecido} - \text{área branco} = \text{área do tecido}$$

Para calcular a marcação na área peritumoral 1 (*offset1*) procedeu-se à subtração da área peritumoral 1, delimitada pelo ROI do *offset1* a área do tumor, delimitada pelo ROI do tumor (Figura 11-A)

$$(\text{ROI do offset 1}) - \text{ROI do tumor} = \text{área peritumoral 1}$$

Para o cálculo da área peritumoral 2 (*offset 2*) marcada pelo D2-40, procedeu-se, à semelhança do anterior, subtração da área peritumoral 2, delimitada pelo ROI do *offset2* a área do *offset1*, delimitada pelo ROI do *offset1* (Figura 11-B) e o mesmo sucedeu para o cálculo da área peritumoral 3 (Figura 11-C).



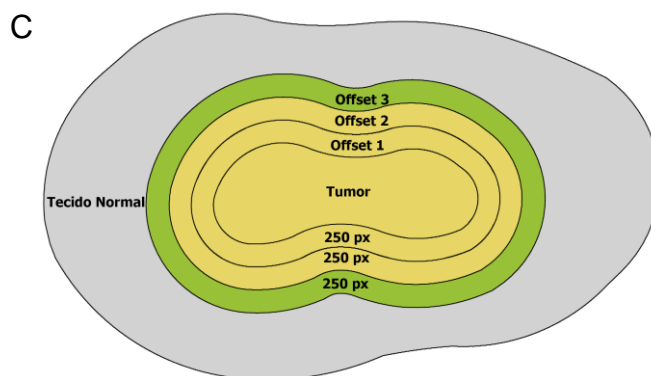


Figura 11 Ilustração do offset's onde se procederam aos cálculos de subtração da área verde pela área amarela. **A** – Demonstração da região peritumoral 1, a verde. **B** – demonstração da região peritumoral 2, a verde. **C** – Demonstração da região peritumoral 3, a verde.

Posteriormente foi realizada uma razão entre a área marcada pelo D2-40 e a área de tecido não marcado, nas zonas intratumorais, peritumorais e no tecido tireoideu normal envolvente, respetivamente, como medida de quantificação da densidade linfática.

3.4. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada usando o programa Graph Pad PRISM 6 para o Windows e usando o SPSS versão 22 para Windows. Para todas as variáveis contínuas foram calculadas as médias e erro padrão da média. Foram efetuados testes de normalidade usando o teste de D'Agostinho & Pearson, para todas as variáveis contínuas (diâmetro, idade, e densidade linfática no tecido intratumoral, peritumoral e normal. Todas elas passaram no teste à exceção do densidade linfática no offset total. Posteriormente procedeu-se a realização de testes ANOVA para as variáveis contínuas. O teste one way-ANOVA com o teste Post-hoc Tukey foi realizado para as variáveis com distribuição normal, e o teste Kruskal Wallis com o teste Post-hoc Dunn's para as variáveis que não reuniram os critérios de normalidade. Posteriormente realizou-se o teste χ^2 para as variáveis nominais (EET, presença de tiroidite, classificação patológica TNM). As correlações de variáveis contínuas foram realizadas recorrendo ao Teste de Spearman. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

4. Resultados.

4.1. Características demográficas da amostra

Para a realização deste estudo foi selecionada uma amostra de doentes com o diagnóstico de tumores da tiróide constituída por carcinomas papilares variante clássica (n=29), carcinomas papilares variante folicular (n=20) e carcinomas medulares (n=42). Porém, da totalidade dos casos selecionados apenas alguns casos (n=50) foram submetidos a análise morfométrica computadorizada, tendo sido incluídos os seguintes doentes com carcinomas papilares da variante clássica (n=21), carcinomas papilares da variante folicular (n=12) e carcinomas medulares (n=17). Foram excluídos da análise as amostras que não eram passíveis de serem analisadas por não apresentarem zona peritumoral, apresentarem zonas peritumorais com tecido adjacente e zonas artefactuais extensas.

A média de idade dos doentes à data do diagnóstico era de $46,58 \pm 2,75$ anos, com um mínimo de 9 e um máximo de 83 anos, sendo significativamente superior nos doentes com carcinomas medulares quando comparada com a idade dos doentes com carcinomas papilares da variante clássica ($p= 0,026$) (Tabela 9).

O diâmetro tumoral foi em média de $22,96 \pm 1,86$ mm, com um mínimo de 6 mm e um máximo de 70 mm, não se verificando diferenças significativas nos diâmetros entre os diferentes tipos histológicos de carcinomas.

Não foram observadas diferenças significativas quanto à frequência de tiroidite, extensão extratumoral, género ou multifocalidade entre os três tipos histológicos estudados (Tabela 9).

Tabela 9 - Tabela relacionando as diferentes categorias com carcinomas papilares variante clássica e variante folicular e com os carcinomas medulares da tiróide.

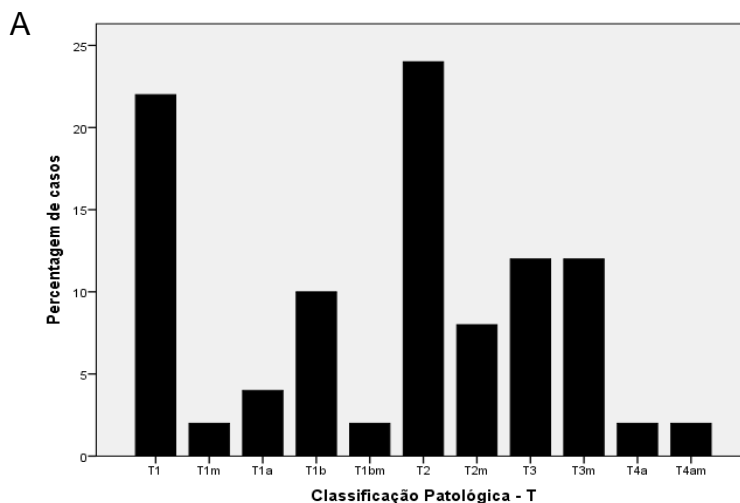
Categorias	Carcinoma Papilar Variante Clássica	Carcinoma Papilar Variante Folicular	Carcinoma Medular	<i>p</i>
Nº de Casos	21	12	17	

Idade (média) (anos)	42,60 ± 4,484	41,25 ± 5,694	56,76 ± 3,485	0,026 ^a
Diâmetro (média) (mm)	21,40 ± 3,062	27,00 ± 4,171	21,94 ± 2,742	NS
Presença de Tiroidite	54,5% (n=6)	27,3 % (n=3)	18,2% (n=2)	NS
Presença de Extensão Extra Tiroideia	61,5% (n=8)	23,1% (n=3)	15,4% (n=2)	NS
Presença de Multifocalidade	61,5% (n=8)	30,8% (n=4)	7,7% (n=1)	NS
Sexo Masculino / Feminino	4:17; 25,0%:51,5%	4:7 25,0%:21,2%	8:9 50,0%: 27,3%	NS

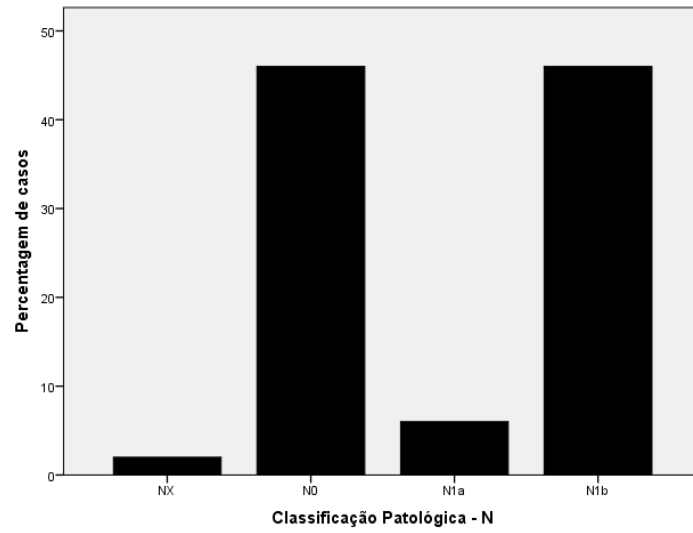
^a – Significativo entre as variáveis carcinoma papilar variante clássica e carcinoma medular.

NS – Não significativo.

Quanto à classificação TNM dos tumores, na classificação T, os tumores mais frequentes foram os T2 em 24,0% dos casos, seguidos dos T1 em 22,0% (Figura 11-A e 13-A); quanto ao N, os tumores mais frequentes foram os N1b e o N0 em 46,0% dos casos (Figura 11-B e 13-B); por último, para a classificação M, os tumores mais frequentes foram os M0 em 74,0% dos casos (Figura 11-C e 13-C).



B



C

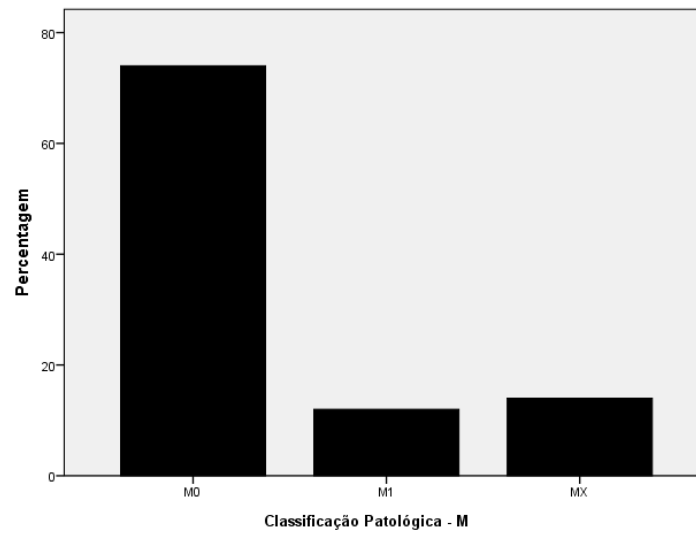
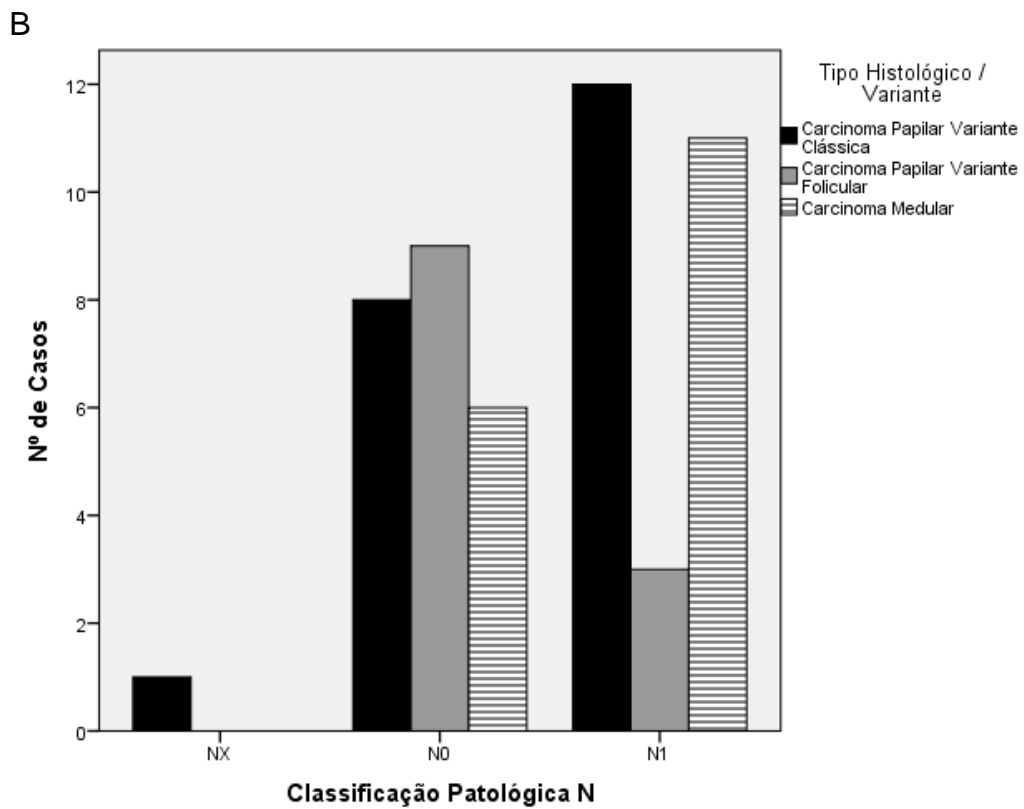
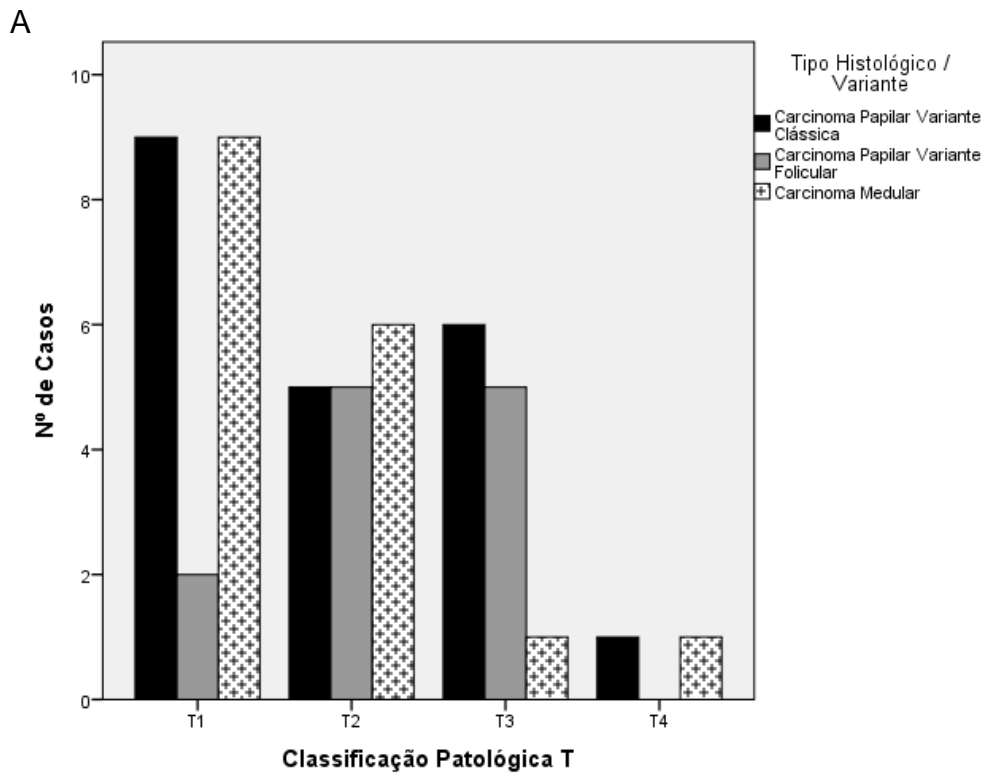


Figura 12 - Gráficos ilustrando as percentagens de tumores da tiróide de acordo com a sua classificação patológica T (A) N (B) M (C).



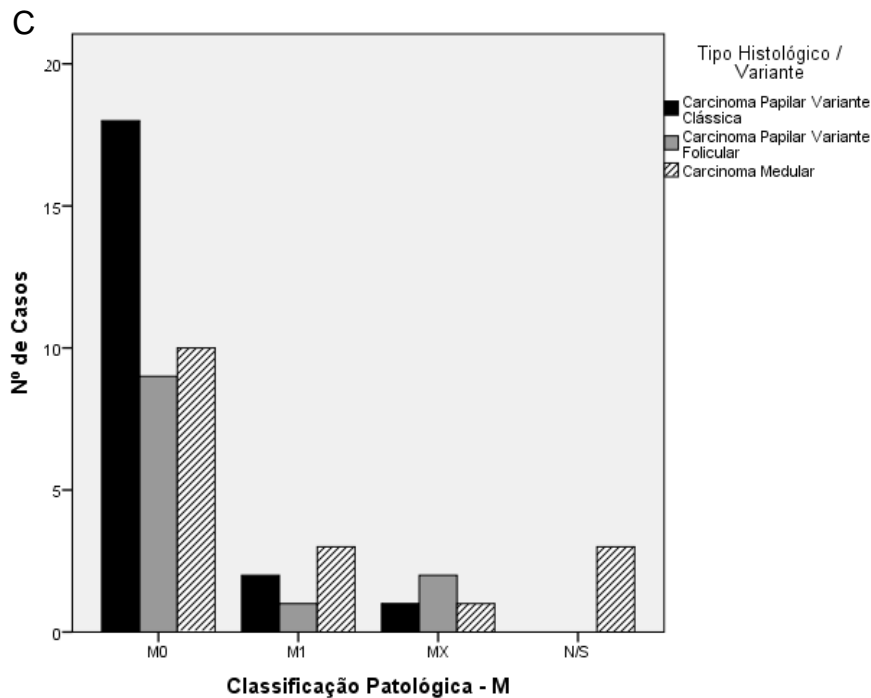
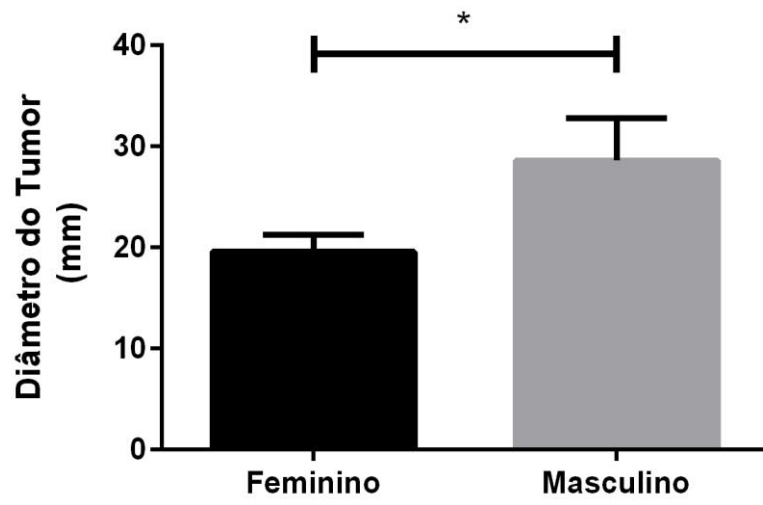


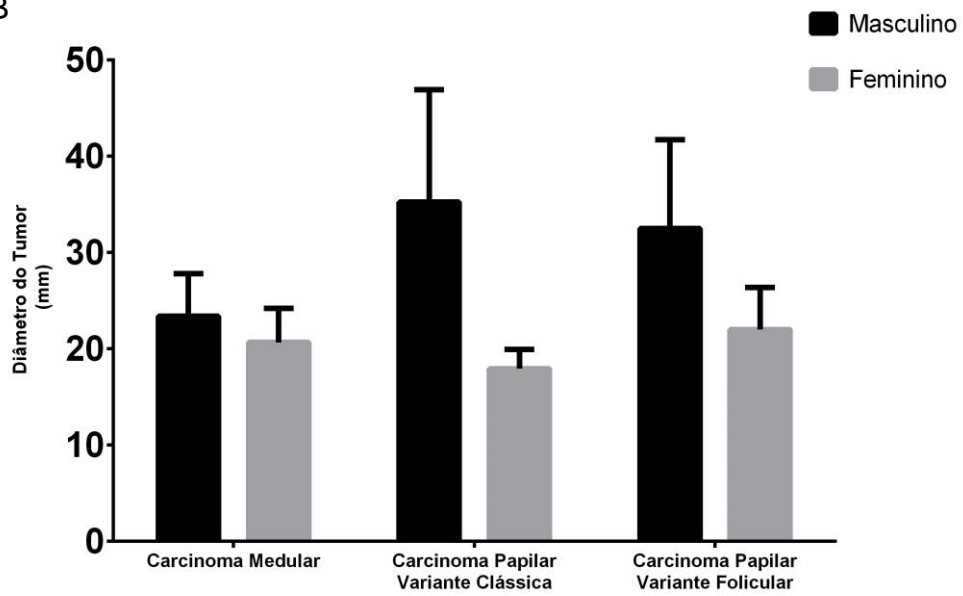
Figura 13 – **A** – Gráfico comparando o número de casos em relação a extensão extra-tiroideia, nos diferentes tipos de carcinomas. **B** – Gráfico comparando o número de casos em relação à classificação patológica N, nos diferentes tipos de carcinomas. **C** – Gráfico comparando o número de casos em relação à classificação patológica N, nos diferentes tipos de carcinomas

A distribuição dos tipos de tumores de acordo com o género foi diferente sendo nesta amostra o carcinoma papilar da variante clássica mais frequente no sexo feminino, embora sem atingir significância estatística (Figura 14-D). No entanto, os carcinomas da tiróide, embora menos frequentes no sexo masculino, apresentaram geralmente estádios T da classificação TMN superiores neste género, embora também sem atingir significância estatística (Figura 14-C). Verificou-se ainda que o diâmetro tumoral dos carcinomas papilares da variante clássica foi significativamente superior no sexo masculino ($p= 0,005$), (Figura 14-A e 14-B).

A



B



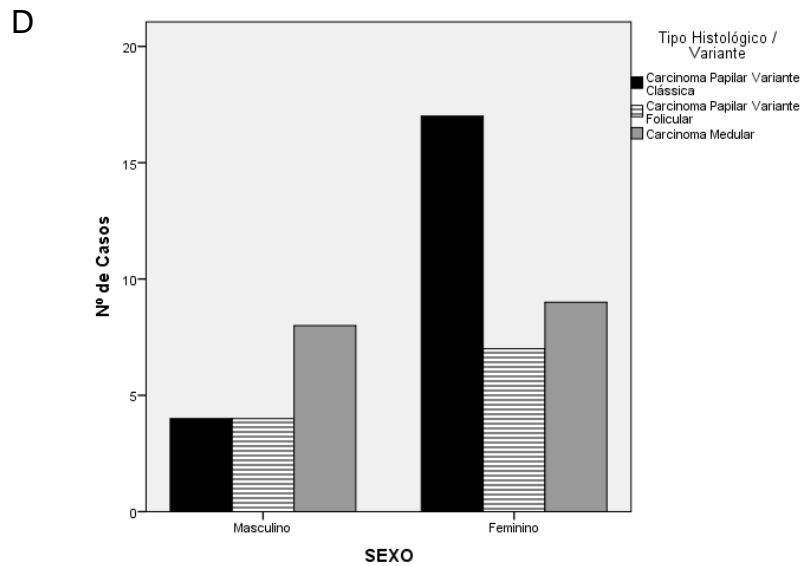
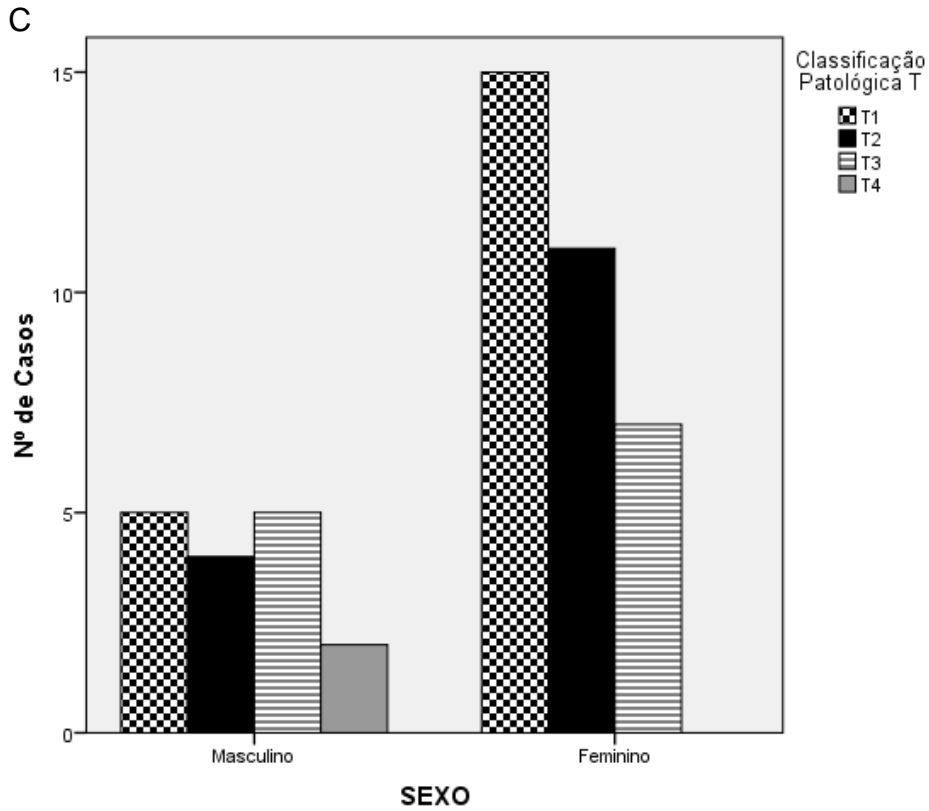


Figura 14 - **A** – Representação gráfica do Diâmetro tumoral da totalidade dos tumores estudados de acordo com o género. **B** – Diâmetro tumoral de acordo com o género, nos diferentes tipos histológicos de carcinomas. **C** – Estadio T da totalidade dos tumores de acordo com o género. **D** – Distribuição da frequência dos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tiróide de acordo com o género.

4.2. Avaliação das densidades linfáticas pela marcação do D2-40

A avaliação das densidades linfáticas foi realizada recorrendo à marcação por imunohistoquímica para o antigénio D2-40, que marca uma sialoglicoproteína transmembranar presente nas células endoteliais linfáticas e a revelação foi efetuada com DAB, que resulta numa marcação de cor castanha na zona da membrana celular, e a contrastação nuclear foi realizada em hematoxilina, que permitiu corar os núcleos de azul (Figura 15).

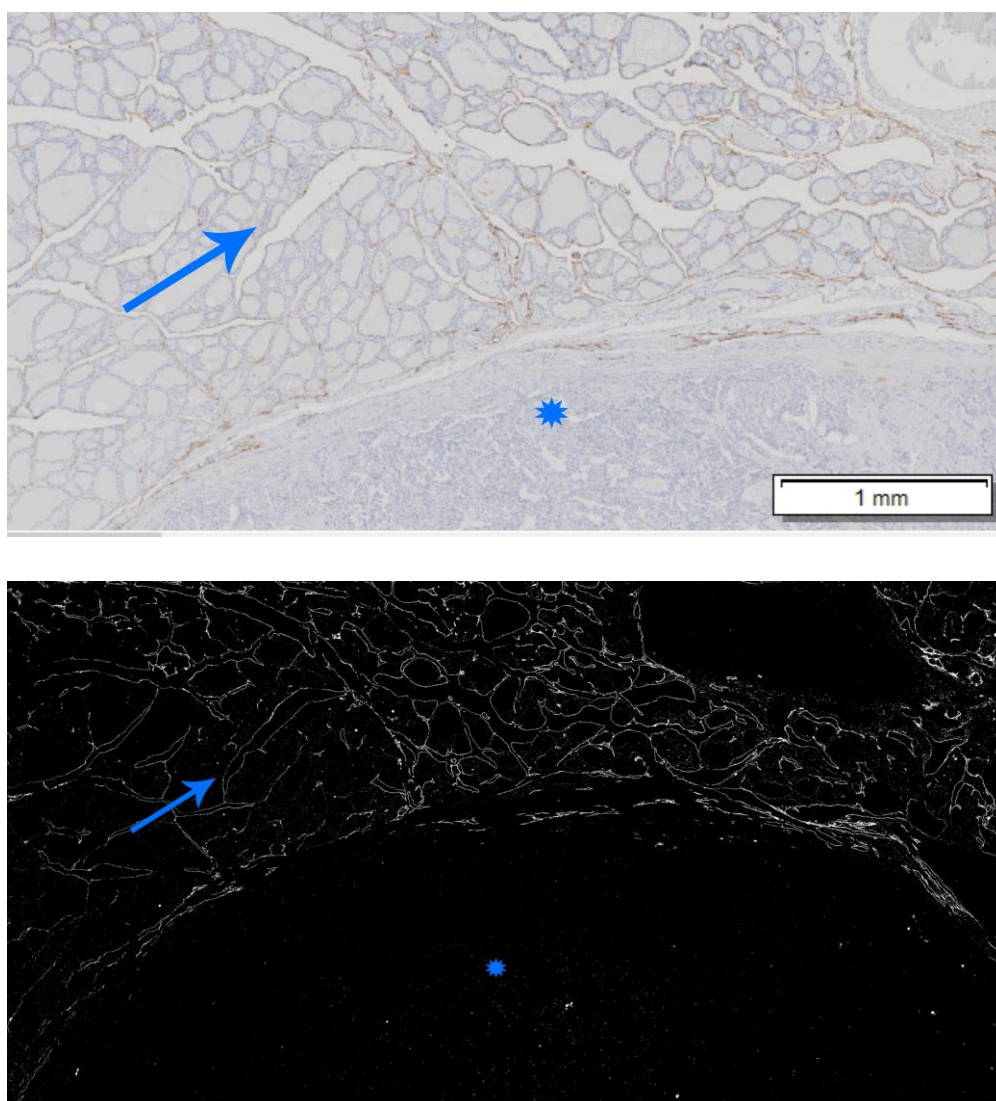


Figura 15 – Fotografia de um carcinoma medular. Asterisco: Tecido tumoral. Seta: tecido tiroideu normal. **A** – Imagem de imunohistoquímica (ampliação 20x). **B** - Imagem resultante do Fiji, realçando a marcação a branco (ampliação 20x)

4.2.1. Densidade linfática intratumoral

A densidade linfática intratumoral foi significativamente maior nos carcinomas papilares da variante clássica quando comparada com a dos carcinomas papilares da variante folicular ($p \leq 0,01$) (Figura 16-A).

A densidade linfática no tecido intratumoral foi ainda significativamente superior no sexo feminino ($p \leq 0.05$) (Figura 16-B).

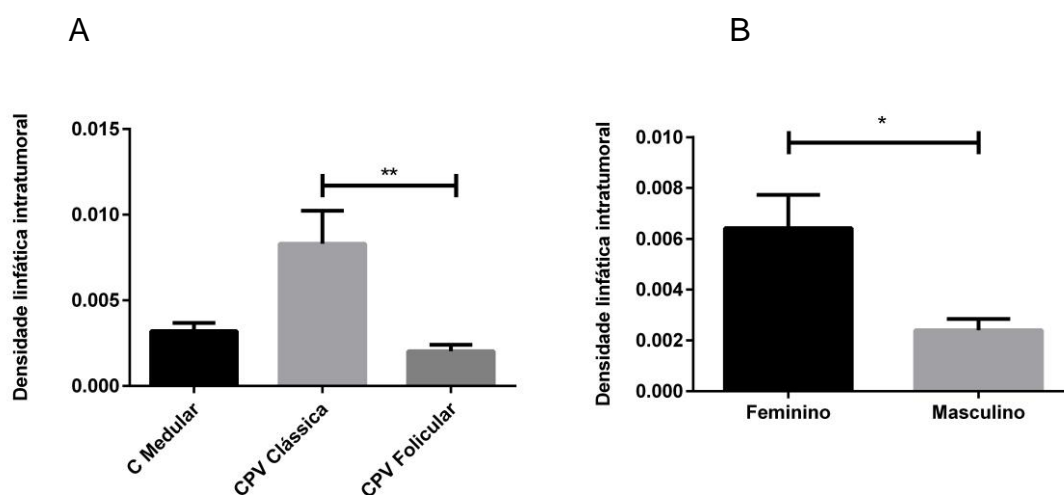


Figura 16 - Densidade linfática intratumoral associada aos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tireoide (A) e de acordo com o género (B).

A densidade linfática intratumoral, nos carcinomas papilares da variante clássica foi significativamente superior na variante clássica quando comparada com a variante folicular ($p \leq 0.05$), independentemente da presença de metastização ($p=NS$) (Figura 17).

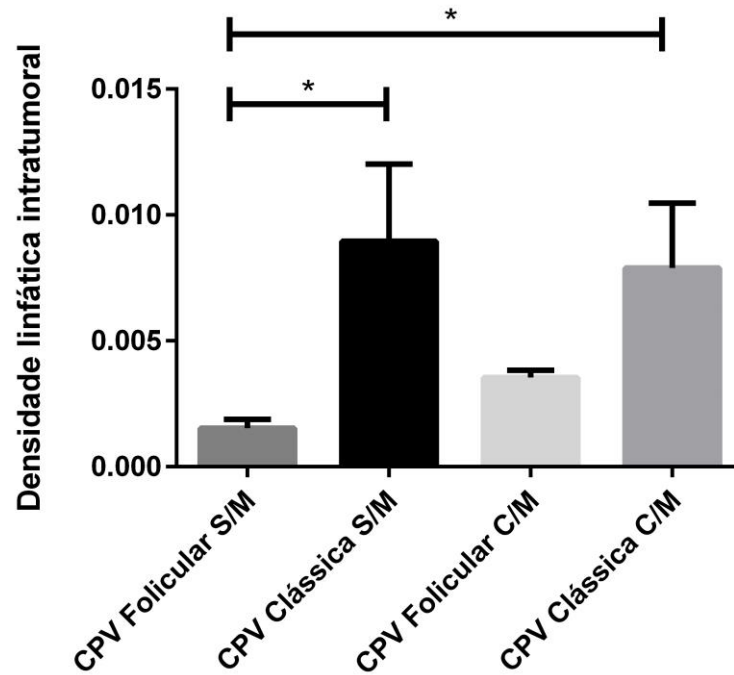
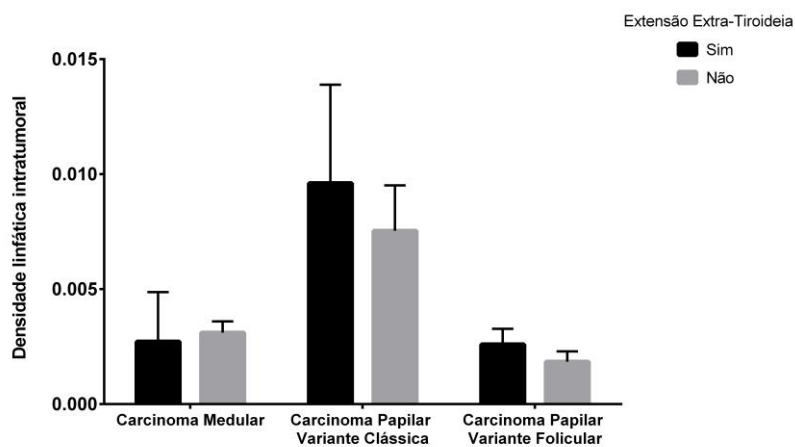


Figura 17 - Gráfico relacionando a densidade linfática intratumoral com o tipo histológico de carcinoma e se metastiza.

A densidade linfática no tecido intra-tumoral foi superior nos carcinomas papilares da variante clássica, independentemente da extensão extra-tiroideia (Figura 18-A) e da metastização ganglionar (Figura 18-B).

A



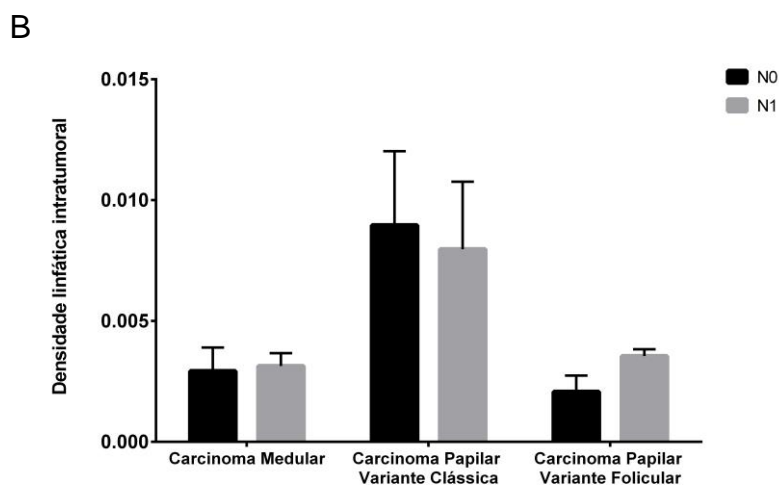


Figura 18 – A e B – Gráficos relacionando a densidade linfática intratumoral com o tipo histológico de carcinoma em relação a extensão extra-tiroideia e a classificação patológica N.

4.2.2. Densidade linfática peritumoral

A densidade linfática peritumoral, nos offset's 1, 2, 3 e somatório total (Figura 19), foi significativamente superior nos carcinomas medulares quando comparada com a densidade linfática dos carcinoma papilares da variante clássica e variante folicular (Figura 20) ($p < 0,05$, para todas as comparações). Não se observaram diferenças na densidade linfática peritumoral (offset's) de acordo com as características clinico-patológicas dos tumores (idade do doente, género, diâmetro do tumor, tiroidite, multifocalidade, EET e classificação

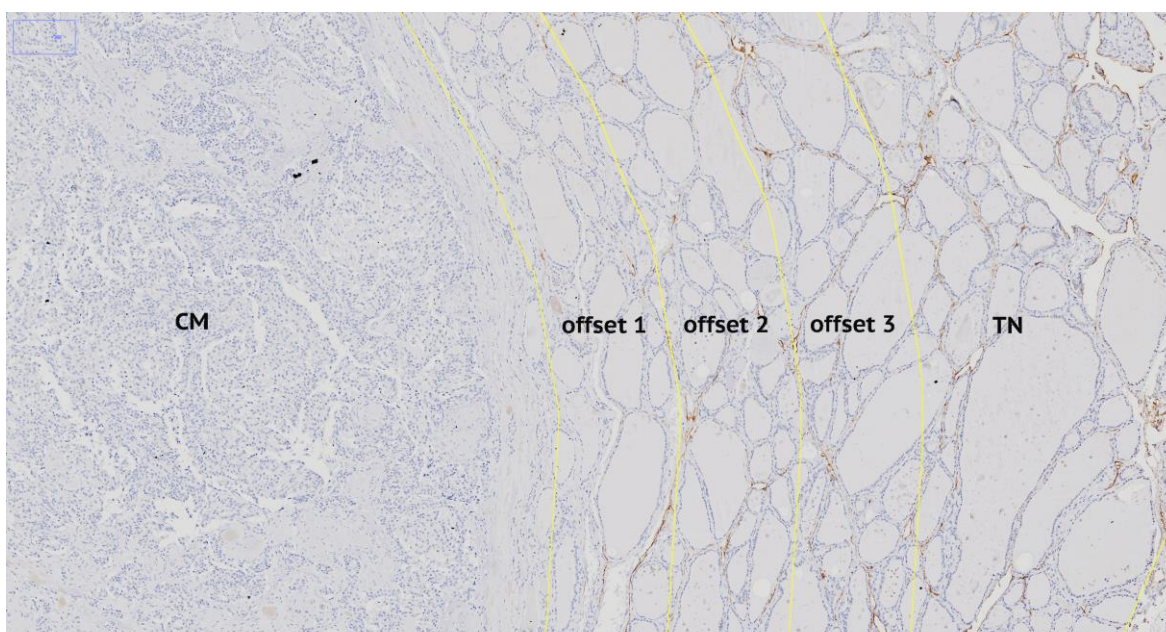


Figura 19 – Fotografia de um carcinoma medular, realçando as zonas peritumorais (offset's) e o tecido normal. CM- Carcinoma Medular; TN – Tecido Normal. (Imunohistoquímica para o D2-40, ampliação 80x)

patológica TNM).

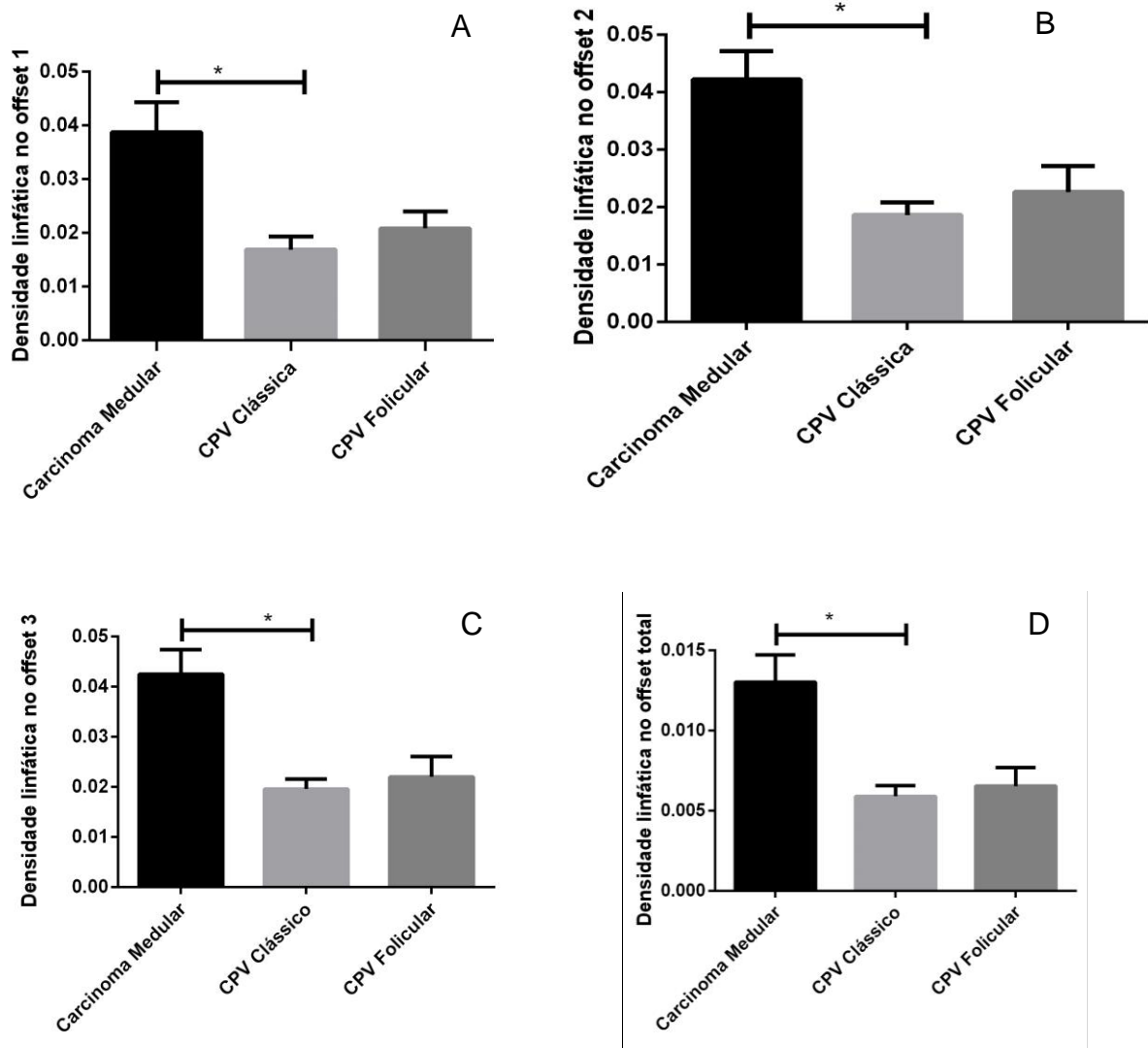
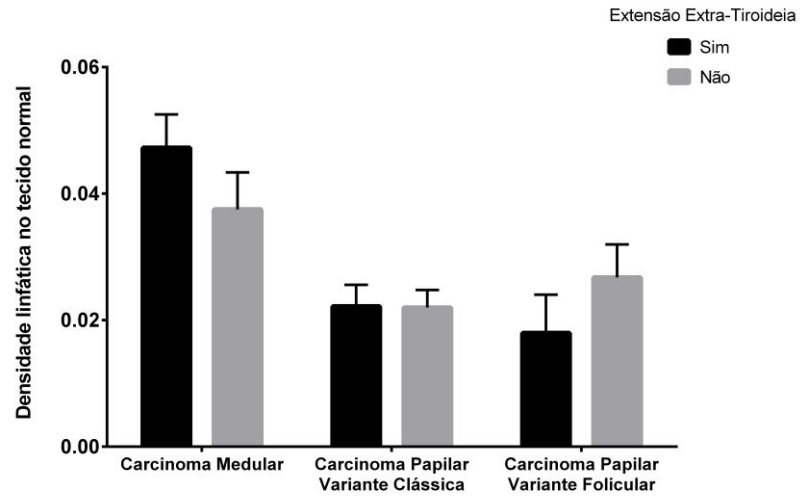


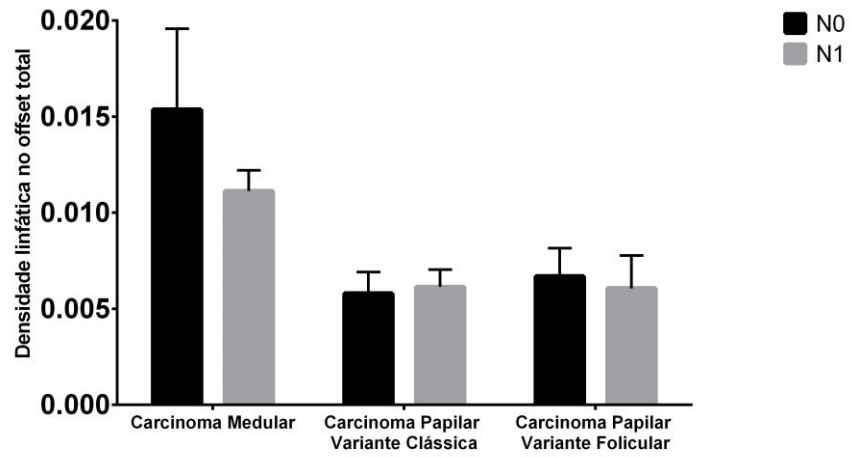
Figura 20 – **A, B, C e D** Densidade linfática nas zonas peritumorais (offset 1, 2, 3 e total) nos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tireoide, sendo significativamente superior nos carcinomas medulares em comparação com os carcinomas papilares da variante clássica em todas as áreas de interesse avaliadas ($p < 0,05$).

A densidade linfática peritumoral (offset 1,2,3 e total) nos carcinomas medulares foi significativamente superior nestes tumores relativamente aos outros tipos histológicos e era independente da extensão extra-tiroideia (Figura 21-A), invasão dos gânglios linfáticos (Figura 21-B), metastização à distância ($p=NS$) (Figura 21-C).

A



B



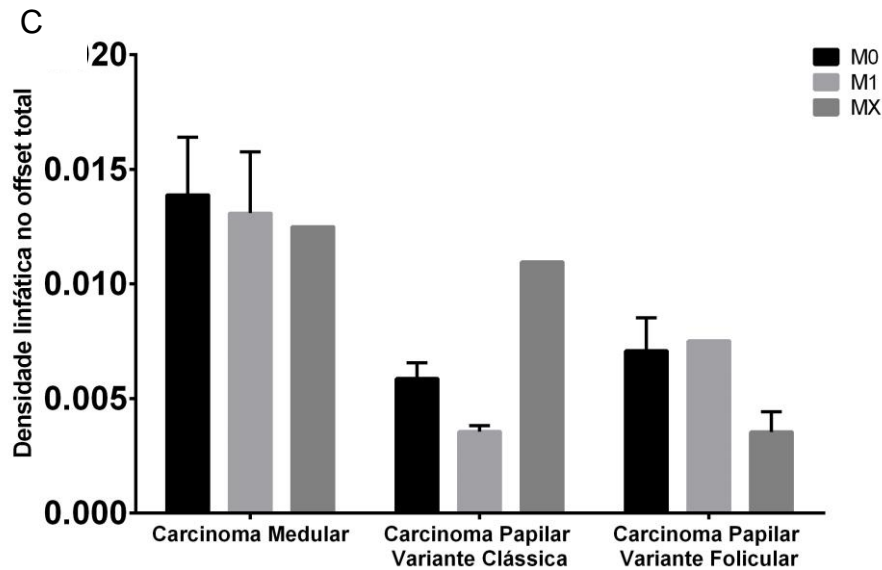


Figura 21 – **A** - A densidade linfática peritumoral total em relação à extensão extratumoral, nos diferentes tipos de carcinomas. **B** - A densidade linfática peritumoral total de acordo com a classificação patológica N, nos diferentes tipos histológicos de carcinomas da tireoide. **C** - A densidade linfática peritumoral total em relação à classificação patológica M, nos diferentes tipos de carcinomas.

4.2.3. Densidade linfática no tecido tiroideu normal.

A densidade linfática no tecido tiroideu normal foi significativamente superior nos carcinomas medulares quando comparada com a dos carcinomas papilares da variante clássica ($p \leq 0.05$) (Figura 22 e 24). Não se observaram diferenças na densidade linfática intratumoral de acordo com as características clinico-patológicas dos tumores (idade do doente, género, diâmetro do tumor, tiroidite, multifocalidade, EET (Figura 23 – A) e classificação patológica TNM (Figura 23 - B e C).

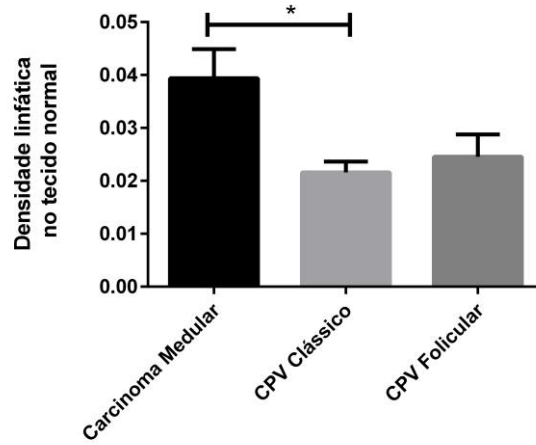
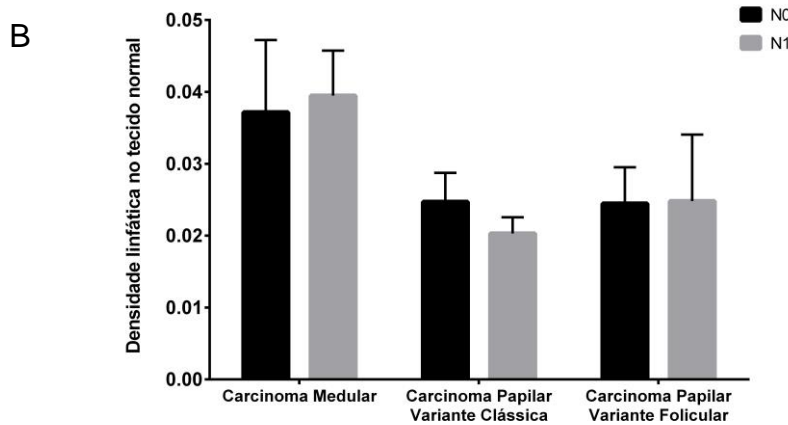
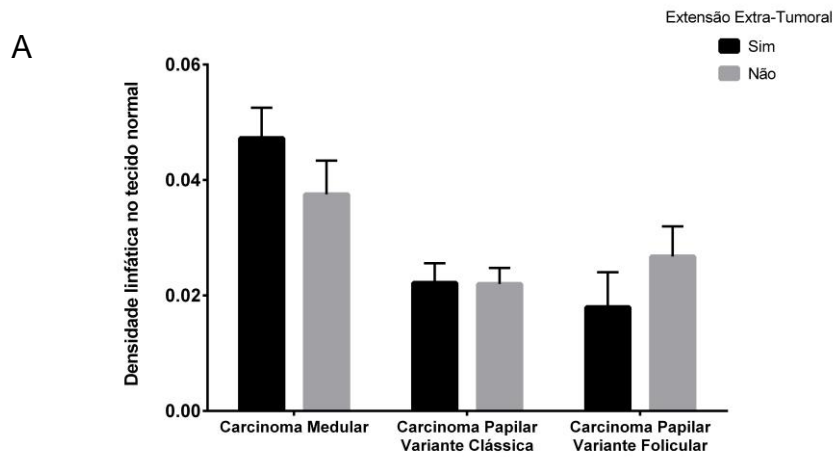


Figura 22 - Gráfico ilustrando a densidade linfática do tecido tiroideu normal nos diferentes carcinomas.



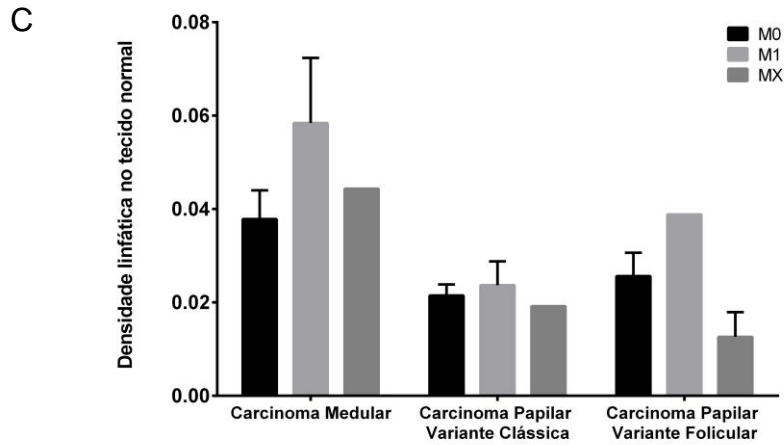


Figura 23 - **A** Densidade linfática do tecido tireoideu normal em relação à extensão extratumoral, nos diferentes tipos de carcinomas. **B** - Densidade linfática do tecido tireoideu normal de acordo com a classificação patológica N, nos diferentes tipos histológicos de carcinomas **C** - Densidade linfática do tecido tireoideu normal de acordo com a classificação patológica M.

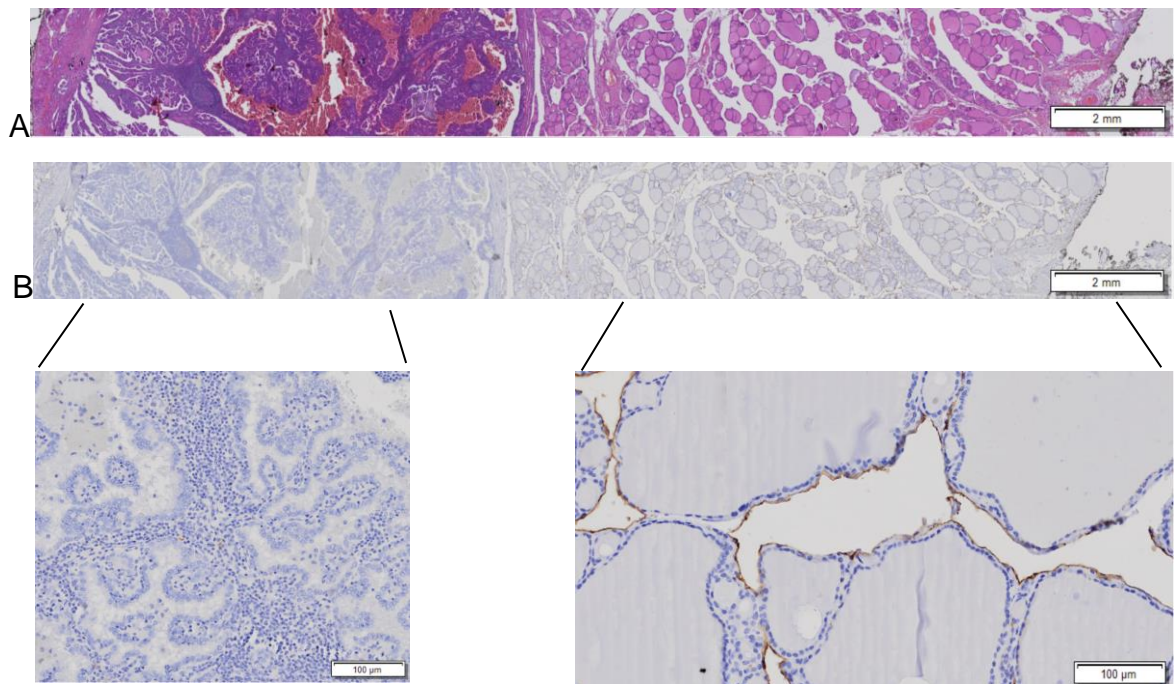


Figura 24 - **A** - Fotografia de uma lâmina histológica em HE com carcinoma papilar variante clássica à esquerda e tecido tireoideu normal a direita (ampliação ~ 20x). **B** - fotografia da mesma lâmina e do mesmo segmento, mas em IHQ para o D-40, com ampliações de 2 segmentos representando as áreas intratumorais e de tecido tireoideu normal.

A densidade linfática no carcinoma medular foi significativamente mais elevada no tecido normal quando comparada com a densidade linfática peritumoral ($p \leq 0.05$) e com a densidade linfática intratumoral ($p \leq 0,001$). A densidade linfática peritumoral foi mais elevada quando comparada com a densidade linfática intratumoral ($p \leq 0,01$) (Figura 25).

No carcinoma papilar variante clássica, a densidade linfática no tecido normal foi significativamente superior quando comparada com a densidade linfática peritumoral ($p \leq 0,001$) e com a densidade linfática intratumoral ($p \leq 0,001$) (Figura 25).

A densidade linfática do tecido tiroideu normal no carcinoma papilar variante folicular foi superior em relação a densidade linfática peritumoral ($p \leq 0,001$) e a densidade linfática intratumoral ($p \leq 0,001$) (Figura 25).

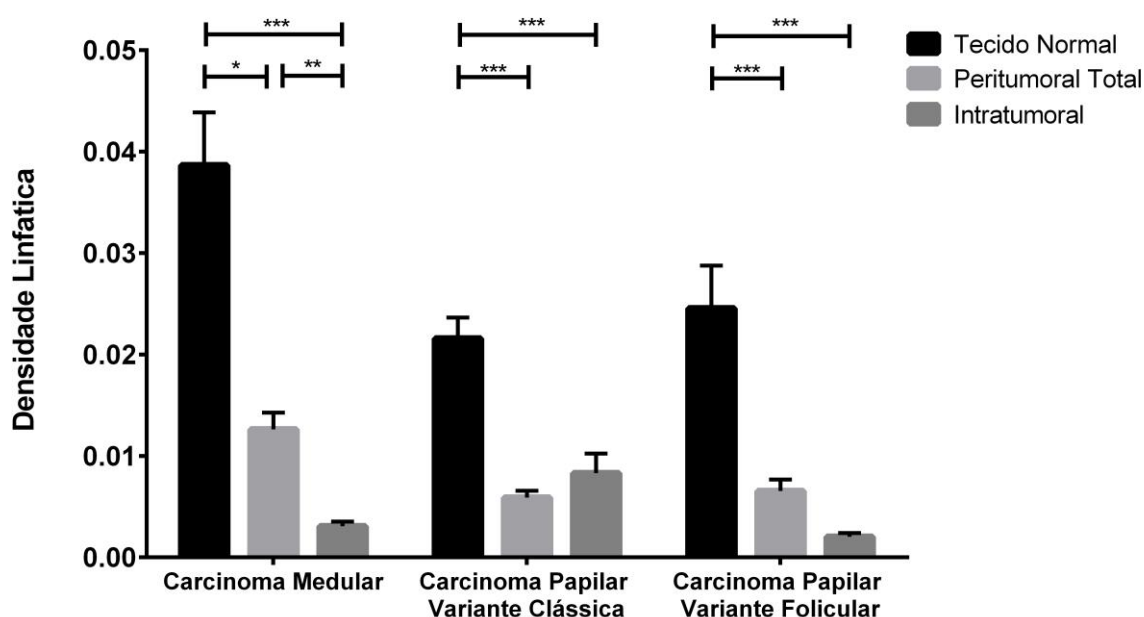


Figura 25 - Gráfico demonstrando a densidade linfática nas diferentes regiões do tecido comparadas com o tipo histológico do carcinoma da tireóide

5. Discussão

As metástases são a principal causa de morte em doentes com cancro e resultam da disseminação das células tumorais por via sanguínea ou linfática (Giorgadze et al 2005), para tecidos à distância da sua origem primária que apresentem microambientes propícios ao seu crescimento e desenvolvimento.

A glândula tiroideia é uma glândula endócrina com características particulares, na qual os dois tipos de carcinomas mais frequentes, com origem no mesmo tipo de célula, a célula epitelial folicular, tendem a metastizar por vias vasculares diferentes, que lhe permite ser um ótimo modelo para o estudo dos mecanismos de angiogénese e linfangiogénese.

O presente estudo teve como objetivo estudar a densidade linfática intratumoral, peritumoral e do tecido tiroideu normal, de carcinomas papilares das variantes clássica e folicular e de carcinomas medulares da tiróide e a sua associação com parâmetros clínico-patológicos, nomeadamente com a idade do doente, género, diâmetro do tumor, presença de tiroidite, EET, multifocalidade e o estágio TNM.

O presente estudo permitiu demonstrar que a densidade linfática peritumoral e do tecido tiroideu normal está aumentada nos carcinomas medulares quando comparada com os carcinomas papilares.

Sendo o carcinoma medular mais invasivo e clinicamente mais agressivo com metastização frequente, é possível que existam características moleculares associadas ao tumor que promovam a linfangiogénese e deste modo o aumento da densidade linfática, permitindo assim a invasão dos tecidos adjacentes e metastização à distância. Por outro lado, o carcinoma medular, pela sua velocidade de crescimento não acompanhada pelo desenvolvimento vascular apresenta também com maior frequência necrose associada, que poderá contribuir juntamente com a hipóxia para o desencadear de processos inflamatórios com libertação de mediadores que poderão recrutar células endoteliais precursoras de capilares linfáticos e desta forma promover a linfangiogénese nas zonas peritumorais (Liao & von der Weid, 2014) (Ji, 2014).

Os carcinomas papilares metastizam preferencialmente por via linfática (Hall, et al, 2005; Giorgadze, et al. 2005) e os carcinomas foliculares metastizam preferencialmente por via hematogénica (Giorgadze, et al, 2005), tendo sido colocada a hipótese desta diferença ser devida a maior densidade linfática associada aos carcinomas papilares.

Os carcinomas papilares podem apresentar algumas variações histológicas, sendo as mais frequentes as variantes clássica e folicular, que embora derivem do mesmo tipo de célula e partilhem algumas características histológicas têm um comportamento biológico distinto quanto à via preferencial de disseminação, uma vez que o carcinoma papilar da variante folicular se comporta de um modo semelhante ao dos carcinomas foliculares, invadindo preferencialmente os vasos sanguíneos (Lin, Zhu, Liu, & Silverman, 2010). E por este motivo, foram escolhidas estas duas variantes de carcinoma papilar para avaliar o papel da densidade linfática associada ao tumor como fator promotor da sua progressão e disseminação. No entanto, no presente estudo não se observaram diferenças na densidade linfática peritumoral entre os carcinomas papilares das duas variantes, clássica e folicular, nem foi detetada nenhuma associação entre a densidade linfática, tanto intratumoral como peritumoral, com o estágio patológico N.

Pelo contrário, foi encontrado uma densidade linfática significativamente superior intratumoral associado aos carcinomas papilares da variante clássica quando comparada com a dos carcinomas papilares da variante folicular. A densidade linfática no tecido intratumoral foi também superior no sexo feminino mas o pequeno número de casos do sexo masculino não permite tirar conclusões definitivas.

Um dos possíveis mediadores da proliferação vascular é o VEGF-C, um fator de crescimento endotelial capaz de induzir a angiogénese e a linfoangiogénese. Vários estudos encontraram já uma correlação entre a expressão de VEGF-C e a ocorrência de metástases para os gânglios linfáticos (Akagi et al., 2000; Bunone et al., 1999; Salven et al., 1998). O VEGF-C parece ser também um dos responsáveis pelo aumento da permeabilidade das células endoteliais linfáticas, favorecendo desta forma a entrada das células tumorais

para a corrente linfática e a adesão das células neoplásicas ao endotélio linfático, de modo independente da linfangiogênese (Leu, Berk, Lymboussaki, Alitalo, & Jain, 2000). Embora, estudos em modelos animais com expressão aumentada de fatores linfoangiogénicos, como VEGF-C e VEGF-D, xeno transplantados, demonstraram ativar a linfoangiogênese, a formação de vasos linfáticos tumorais e o aumento da metastização ganglionar e à distância (Albrecht & Christofori, 2011).

O presente estudo vem contrariar os resultados de estudos prévios nos quais foi documentada existir uma correlação positiva entre da densidade linfática intratumoral e a presença loco-regional de metástases (Jackson, Prevo, Clasper, & Banerji, 2001).

À semelhança do presente estudo também Eloy C. *et al* e Georgadze *et al* não encontraram relação entre a densidade linfática peritumoral com características clinico-patológicas dos tumores, nomeadamente com a presença de metástases ganglionares (Hall. F.T. *et al*, Eloy, C *et al* e Choi Y. *et al*). Além do mais, o presente estudo demonstrou que a variante clássica do carcinoma papilar tem uma maior densidade linfática intratumoral do que a variante folicular do carcinoma papilar da tiroide e a densidade linfática é superior no sexo feminino. Contudo o estudo elaborado pela Eloy, C *et al* demonstrou que a densidade linfática intratumoral se correlacionava com a EET, invasão vascular linfática e metástases ganglionares, o que não foi observado neste estudo.

Uma possível explicação para a discrepância entre os resultados encontrados nos diferentes estudos foi terem sido utilizado métodos de análise distintos. No presente estudo, foi utilizado um método de análise morfométrica computadorizada, enquanto nos estudos anteriores foi utilizado um método de análise tradicional por *hotspots*, que ao contrário do método computadorizado que permite avaliar pelo *software* todas as zonas de interesse intratumorais e peritumorais independentemente se ser representativa ou não, o anterior fica restrito a zonas representativas da amostra seleccionadas ao critério do avaliador. Um processo manual, que pode criar um viés de seleção.

Porém, apesar das vantagens da análise computadorizada, persistem algumas limitações comuns a ambas as técnicas. A principal limitação relaciona-

se com a representatividade tridimensional da amostra, isto é, ao efetuar os cortes histológicos, os vasos linfáticos são seccionados nos diversos planos possíveis e perde-se a noção tridimensional da amostra, passando para um plano bidimensional. Para ultrapassar esta limitação seria necessário realizar cortes seriados com intervalos de 10 a 20 μm e reconstruir tridimensionalmente a amostra, de forma a perder o mínimo de informação. Por outro lado, a técnica de análise morfométrica computadorizada, embora menos do que a técnica por *hotspots*, ainda apresenta algumas variáveis dependentes do utilizador.

Embora existam recursos para as minimizar que foram aplicados no presente estudo, nomeadamente a análise das lâminas foi toda realizada pelo mesmo observador e em condições semelhantes; as imagens foram adquiridas num digitalizador automático de lâminas com parâmetros luminosidade iguais para todas as lâminas; o *threshold* escolhido, uma vez que é dos parâmetros mais sensíveis do Fiji, foi semelhante de forma a obter imagens mais homogêneas entre si; as imagens foram redimensionadas a 75% da sua dimensão original do formato de ficheiro ETS*, após realizar um estudo que demonstrou ser esta a percentagem de redução mais segura no sentido de não perder qualidade da informação obtida em formato TIFF*; e finalmente optou-se por realizar a imunohistoquímica no mesmo dia em todas as lâminas de modo a manter constantes as condições de temperatura e humidade.

6. Conclusão

O presente estudo veio demonstrar que a densidade linfática do tecido tiroideu normal e peritumoral está aumentada nos carcinomas medulares da tiróide em relação às mesmas zonas nos carcinomas papilares, variantes clássica ou folicular. Não se observaram diferenças significativas na densidade linfática do tecido tiroideu normal ou peritumoral entre estes 2 tipos histológicos dos carcinomas papilares, ou qualquer relação com a extensão extratumoral, invasão ganglionar ou metastização, que possam justificar o distinto padrão de disseminação. Pelo contrário, foi observada uma maior densidade linfática intratumoral dos doentes do sexo feminino, nos carcinomas papilares da variante clássica em comparação com o da variante folicular.

Estes resultados sugerem que as diferenças observadas na densidade da rede linfática tumoral e peritumoral possam contribuir para o diferente padrão de metastização tumoral.

No entanto serão necessários estudos adicionais por forma a compreender o significado biológico da alteração da densidade linfática observada assim como os mecanismos moduladores da linfoangiogénese no tecido tiroideu adjacente a estes tumores.

7. Bibliografia

- Akagi, K., Ikeda, Y., Miyazaki, M., Abe, T., Kinoshita, J., Maehara, Y., & Sugimachi, K. (2000). Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Br J Cancer*, *83*(7), 887-891. doi: 10.1054/bjoc.2000.1396
- Albrecht, I., & Christofori, G. (2011). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol*, *55*(4-5), 483-494. doi: 10.1387/ijdb.103226ia
- Bunone, G., Vigneri, P., Mariani, L., Buto, S., Collini, P., Pilotti, S., . . . Bongarzone, I. (1999). Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol*, *155*(6), 1967-1976. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65515-0
- Cassol, C. A., & Asa, S. L. (2010). Molecular pathology of thyroid cancer. *Diagnostic Histopathology*, 124-138.
- Choi, Y., Park, K. J., Ryu, S., Kim, D. H., Yun, J., Kang, D. K., & Chun, M. (2012). Papillary thyroid carcinoma involving cervical neck lymph nodes: correlations with lymphangiogenesis and ultrasound features. *Endocr J*, *59*(10), 941-948.
- Christiansen, A., & Detmar, M. (2011). Lymphangiogenesis and Cancer. *Genes & Cancer*, *12*, 1146-1158.
- Christiansen, A., & Detmar, M. (2011). Lymphangiogenesis and cancer. *Genes Cancer*, *2*(12), 1146-1158. doi: 10.1177/1947601911423028
- Da, M. X., Wu, Z., & Tian, H. W. (2008). Tumor lymphangiogenesis and lymphangiogenic growth factors. *Arch Med Res*, *39*(4), 365-372. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.12.005
- de la Torre, N. G., Buley, I., Wass, J. A., & Turner, H. E. (2006). Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. *Endocr Relat Cancer*, *13*(3), 931-944. doi: 10.1677/erc.1.01210
- Dellaire, G., Berman, J., & Arceci, R. (2014). *Cancer genomics : from bench to personalized medicine*. Amsterdam: Academic Press.
- Drake, R. L., Vogl, W., Mitchell, A. W. M., Gray, H., & Gray, H. A. (2010). *Gray's anatomy for students* (2nd ed. ed.). Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier.
- Eloy, C., Santos, J., Soares, P., & Sobrinho-Simoes, M. (2011). Intratumoural lymph vessel density is related to presence of lymph node metastases and separates encapsulated from infiltrative papillary thyroid carcinoma. *Virchows Arch*, *459*(6), 595-605. doi: 10.1007/s00428-011-1161-3
- Fellmer, P. T., Sato, K., Tanaka, R., Okamoto, T., Kato, Y., Kobayashi, M., . . . Obara, T. (1999). Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas. *Surgery*, *126*(6), 1056-1061; discussion 1061-1052.
- Garcia, E. A., Simoes, K., Wakamatsu, A., Ressio, R. A., Alves, V. A., Longatto-Filho, A., & Camargo, R. S. (2010). Lymphatic vessel density and VEGF-C expression are significantly different among benign and malignant thyroid lesions. *Endocr Pathol*, *21*(2), 101-107. doi: 10.1007/s12022-010-9116-9

- Giorgadze, T. A., Baloch, Z. W., Pasha, T., Zhang, P. J., & Livolsi, V. A. (2005). Lymphatic and blood vessel density in the follicular patterned lesions of thyroid. *Mod Pathol*, 18(11), 1424-1431. doi: 10.1038/modpathol.3800452
- Hall, F. T., Freeman, J. L., Asa, S. L., Jackson, D. G., & Beasley, N. J. (2003). Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129(7), 716-719. doi: 10.1001/archotol.129.7.716
- Jackson, D. G., Prevo, R., Clasper, S., & Banerji, S. (2001). LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol*, 22(6), 317-321.
- Ji, R. C. (2014). Hypoxia and lymphangiogenesis in tumor microenvironment and metastasis. *Cancer Lett*, 346(1), 6-16. doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.001
- Jung, C. K., Kang, Y. G., Bae, J. S., Lim, D. J., Choi, Y. J., & Lee, K. Y. (2010). Unique patterns of tumor growth related with the risk of lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*, 23(9), 1201-1208. doi: 10.1038/modpathol.2010.116
- Jung, Y. Y., Lee, C. H., Park, S. Y., Park, H. J., Min, H. S., Won, J. K., . . . Ryu, H. S. (2013). Characteristic tumor growth patterns as novel histomorphologic predictors for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol*, 44(12), 2620-2627. doi: 10.1016/j.humpath.2013.07.025
- Kumar, V., & Kumar, V. (2010). *Robbins and Cotran's pathologic basis of disease* (8th ed. / Vinay Kumar. ed.). Philadelphia, Pa. ; London: Saunders.
- Leu, A. J., Berk, D. A., Lymboussaki, A., Alitalo, K., & Jain, R. K. (2000). Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*, 60(16), 4324-4327.
- Liao, S., & von der Weid, P. Y. (2014). Inflammation-induced lymphangiogenesis and lymphatic dysfunction. *Angiogenesis*, 17(2), 325-334. doi: 10.1007/s10456-014-9416-7
- Lin, X., Zhu, B., Liu, Y., & Silverman, J. F. (2010). Follicular thyroid carcinoma invades venous rather than lymphatic vessels. *Diagn Pathol*, 5, 8. doi: 10.1186/1746-1596-5-8
- LiVolsi, V. A. (2011). Papillary thyroid carcinoma: an update. *Mod Pathol*, 24 Suppl 2, S1-9. doi: 10.1038/modpathol.2010.129
- LiVolsi, V. A., Abrosimov, A. A., Bogdanova, T., Fadda, G., Hunt, J. L., Ito, M., . . . Williams, E. D. (2011). The Chernobyl thyroid cancer experience: pathology. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 23(4), 261-267. doi: 10.1016/j.clon.2011.01.160
- Massi, D., & Gokoz, O. (2010). The biological significance of lymphangiogenesis in human tumours. *Diagnostic Histopathology*, 295-305.
- Mathur, A., Olson, M. T., & Zeiger, M. A. (2014). Follicular lesions of the thyroid. *Surg Clin North Am*, 94(3), 499-513. doi: 10.1016/j.suc.2014.02.005
- Mescher, A. L., & Junqueira, L. C. U. a. B. h. (2010). *Junqueira's basic histology : text and atlas* (12th ed. ed.). New York ; London: McGraw-Hill Medical.
- Nikiforov, Y. E., & Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*, 7(10), 569-580. doi: 10.1038/nrendo.2011.142
- Omur, O., & Baran, Y. (2014). An update on molecular biology of thyroid cancers. *Crit Rev Oncol Hematol*, 90(3), 233-252. doi: 10.1016/j.critrevonc.2013.12.007
- Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., Jaaskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., . . . Joensuu, H. (1998). Vascular endothelial growth factors VEGF-B

- and VEGF-C are expressed in human tumors. *Am J Pathol*, 153(1), 103-108. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65550-2
- Schlumberger, M., & Pacini, F. (1997). *Tumeurs de la thyroïde*. Paris: Nucléon.
- Sipos, J. A., & Mazzaferri, E. L. (2010). Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 22(6), 395-404. doi: 10.1016/j.clon.2010.05.004
- Sobrinho-Simoes, M., Eloy, C., Magalhaes, J., Lobo, C., & Amaro, T. (2011). Follicular thyroid carcinoma. *Mod Pathol*, 24 Suppl 2, S10-18. doi: 10.1038/modpathol.2010.133
- Stacker, S. A., Williams, S. P., Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S. B., & Achen, M. G. (2014). Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer*, 14(3), 159-172. doi: 10.1038/nrc3677
- Thompson, L. D. R. (2012). *Head and neck pathology* (2nd ed.). Philadelphia, Pa. ; London: Saunders.
- Vu-Phan, D., & Koenig, R. J. (2014). Genetics and epigenetics of sporadic thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 386(1-2), 55-66. doi: 10.1016/j.mce.2013.07.030
- Wakeford, R. (2004). The cancer epidemiology of radiation. *Oncogene*, 23(38), 6404-6428. doi: 10.1038/sj.onc.1207896
- Williams, D. (2008). Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene*, 27 Suppl 2, S9-18. doi: 10.1038/onc.2009.349
- Yasuoka, H., Nakamura, Y., Zuo, H., Tang, W., Takamura, Y., Miyauchi, A., . . . Kakudo, K. (2005). VEGF-D expression and lymph vessels play an important role for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*, 18(8), 1127-1133. doi: 10.1038/modpathol.3800402
- Yu, X. M., Lo, C. Y., Chan, W. F., Lam, K. Y., Leung, P., & Luk, J. M. (2005). Increased expression of vascular endothelial growth factor C in papillary thyroid carcinoma correlates with cervical lymph node metastases. *Clin Cancer Res*, 11(22), 8063-8069. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0646