Gilton Marques Fonseca

A importância prognóstica dos grupamentos pouco
diferenciados e brotamentos tumorais nas metástases
hepáticas do câncer colorretal

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Ciências em
Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Herman

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fonseca, Gilton Marques

A importância prognóstica dos grupamentos pouco
diferenciados e brotamentos tumorais nas metástases
hepáticas do câncer colorretal / Gilton Marques
Fonseca. -- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: Paulo Herman.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais
2.Metástase neoplásica 3.Fígado 4.Hepatectomia
5.Patologia cirúrgica 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-291/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

DEDICATÓRIA

A Deus, Doador da vida e Fonte da sabedoria.

Aos meus pais Otoniel e Gilca, modelos de pessoas amorosas, bondosas e prestativas, sempre presentes em todos os momentos, incentivando e apoiando ilimitadamente.

À minha irmã Greice, que sempre demonstrou carinho, incentivo e companhia irrestritos.

À tia Geni, minha segunda mãe, sempre presente em toda a jornada da vida, dando carinho, cuidado e apoio.

Aos pacientes portadores desta enfermidade, motivo maior deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Paulo Herman, pela amizade e orientação, não apenas durante esta tese, mas durante toda a formação como médico e cirurgião. Sua liderança permitiu a liberdade da criação e desenvolvimento individual sempre aliados ao apoio constante e orientação segura e acertada.

Ao Professor Evandro Sobroza de Mello, que me apresentou os brotamentos tumorais, por ter tornado esta tese muito mais profunda e completa e por ter aberto as portas dos Laboratórios de Patologia para que tudo isso fosse possível.

Ao Professor Ivan Cecconello, pelo apoio e orientação desde o início da residência.

Ao Professor Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, pelo apoio e orientação, em especial na pós-graduação.

Ao Professor Venancio Avancini Ferreira Alves, por ter apoiado este projeto, aberto as portas do Departamento de Patologia para que fosse possível a realização do mesmo e auxiliado grandemente na publicação dos artigos derivados desta tese.

Ao Professor Marcel Cerqueira Cesar Machado, pelos valiosos ensinamentos e amizade.

Ao Professor José Jukemura, pela amizade, orientação e apoio na vida profissional e na pós-graduação; por fazer possível a minha primeira publicação, inclusive com investimentos financeiros pessoais.

Ao Professor André Luis Montagnini, pelo apoio e amizade sempre presentes.

À Doutora Sheila Friedrich Faraj, pela competência, eficiência e paciência ao analisar as 916 lâminas que constituíram esta tese nas aproximadas 150 horas de trabalho no laboratório. Nada disso seria possível sem você.

Aos Doutores Fabrício Ferreira Coelho, Fábio Ferrari Makdissi, Jaime Arthur Pirola Krüger e Vagner Birk Jeismann, amigos com quem tenho o privilégio e a honra de aprender e trabalhar no Serviço de Cirurgia do Fígado do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Doutor Renato Micelli Lupinacci, que me apresentou a linha de pesquisa em avaliações anatomopatológicas das metástases de câncer colorretal.

Ao Doutor Emerson Shigueaki Abe, por ter acreditado no meu trabalho e pelas oportunidades profissionais que me proporcionou, e ao Doutor Rodrigo Blanco Dumarco pela parceria profissional.

Aos queridos Professor Gil da Costa Marques e Doutora Silvana Moraes Marques, a quem tenho o privilégio de chamar de tios, mas que me acolheram como filho em São Paulo. Estendo aqui os agradecimentos aos tios e primos, e são muitos, que indiretamente contribuíram na construção desta tese, com carinho e incentivos irrestritos.

À Srta. Rossana Verónica Mendoza López, pela participação na análise estatística desta tese, de modo rápido e eficaz.

A todos os técnicos de laboratório que, através de seu trabalho, tornaram possível a realização desta tese, em especial ao Sr. Douglas Moreira (Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade da São Paulo), às Sras. Regiane Silva dos Santos e Maiara Vicente Silva (Serviço de Patologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo) e à Sras. Alda Wakamatsu e Aline Kawassaki Assato (Laboratório de Investigação Médica 14 - Patologia Hepática).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por apoiar e acreditar neste projeto, fornecendo recursos financeiros fundamentais à sua realização.

À secretária da pós-graduação, Srta. Vilma de Jesus Libério, e às secretárias da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo, em especial às Sras. Myrtes Freire de Lima e Fabiana Renata Soares Bispo, pelo apoio, prestatividade e disponibilidade sempre presentes.

"Nenhum de nós é tão bom quanto todos nós, juntos."

Raymond Albert Kroc

"Se algum de vocês tem falta de sabedoria, peça-a a Deus, que a todos dá livremente, de boa vontade; e lhe será concedida."

Tiago 1:5

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Critérios prognósticos anatomopatológicos	3
1.1.1 Fatores prognósticos anatomopatológicos intra-hepáticos	4
1.2 A transição epitélio-mesenquimal e a disseminação tumoral	5
1.2.1 Brotamentos tumorais	6
1.2.2 Grupamentos pouco diferenciados.....	9
1.3 Justificativa.....	10
2 OBJETIVOS.....	11
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Casuística	12
3.2 Aprovação na CAPPesq e fonte de financiamento	12
3.3 Critérios de inclusão.....	13
3.4 Critérios de exclusão.....	13
3.5 Características clínicas	14
3.6 Avaliação anatomopatológica	15
3.6.1 Brotamentos tumorais	16
3.6.2 Grupamentos pouco diferenciados.....	18
3.6.3 Invasão linfática intra-hepática	18
3.6.4 Invasão venosa portal intra-hepática.....	18
3.6.5 Outras avaliações com coloração por hematoxilina e eosina	19

3.7 Seguimento	24
3.8 Análise estatística	24
4 RESULTADOS	26
4.1 População avaliada.....	26
4.2 Características clínicas da população estudada.....	27
4.3 Características anatomopatológicas da população estudada.....	31
4.4 Variáveis clínicas e anatomopatológicas e sobrevida global.....	35
4.5 Variáveis clínicas e anatomopatológicas e sobrevida livre de doença	42
4.6 Fatores associados à recidiva hepática	45
4.7 Concordância entre hematoxilina e eosina e AE1/AE3 na avaliação dos brotamentos tumorais e grupamentos pouco diferenciados	47
4.8 Associação entre os brotamentos tumorais e grupamentos pouco diferenciados e as outras variáveis clínicas e patológicas.....	48
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÕES.....	66
7 REFERÊNCIAS	67
Apêndices	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais alterações da transição epitélio-mesenquimal (TEM), que permitem às células epiteliais adquirirem fenótipo mesenquimal e contribuir para maior invasividade tumoral.....	6
Figura 2 - Ilustração das classificações dos brotamentos tumorais, conforme Hase (A), Nakamura (B) e método quantitativo, com contagem em 10 campos de grande aumento (C).....	17
Figura 3 - Brotamentos tumorais (setas) identificados através de coloração por hematoxilina e eosina (40x).....	20
Figura 4 - Brotamentos tumorais (cabeças de seta) realçados por imunohistoquímica para AE1/AE3 (40x).	20
Figura 5 - Grupamentos pouco diferenciados (setas) identificados na coloração por hematoxilina e eosina (20x).	21
Figura 6 - Grupamentos pouco diferenciados (setas) realçados por imunohistoquímica com AE1/AE3 (20x).....	21
Figura 7 - Invasão linfática, caracterizada por células tumorais (seta) em espaços revestidos por células endoteliais com imunorreatividade para D2-40 (20x).	22
Figura 8 - Invasão venosa portal, caracterizada por células tumorais (seta) vistas em espaços revestidos por células endoteliais dos vasos sanguíneos marcadas por CD34 (20x).....	22
Figura 9 - Borda expansiva com fibrose peritumoral acentuada (pseudocápsula espessa) e infiltrado inflamatório peritumoral moderado, na coloração por hematoxilina e eosina.....	23
Figura 10 - Padrão de borda tumoral infiltrativa vista na coloração por hematoxilina e eosina, caracterizada por crescimento tumoral com projeções dissecando o parênquima hepático adjacente (10x).	23
Figura 11 - População estudada.....	26

Figura 12 - Curvas de sobrevida global (A) e de sobrevida livre de doença (B) dos pacientes submetidos a ressecção de metástases hepáticas de câncer colorretal.....	31
Figura 13 - Curvas de sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, conforme a presença de brotamentos tumorais (BT) pelo AE1/AE3 (A) e pela hematoxilina e eosina (HE) (B) e conforme a presença dos grupamentos pouco diferenciados (GPD) pelo AE1/AE3 (C) e hematoxilina e eosina (D).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes submetidos a ressecção de metástases hepáticas de câncer colorretal.	29
Tabela 2 - Características dos brotamentos tumorais (BT) nas metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.	32
Tabela 3 - Características dos grupamentos pouco diferenciados (GPD) nas metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.	33
Tabela 4 - Características de outras variáveis patológicas avaliadas nas metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.	34
Tabela 5 - Sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, segundo a presença de brotamentos tumorais.	36
Tabela 6 - Sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal, segundo presença de grupamentos pouco diferenciados.	37
Tabela 7 - Fatores prognósticos para sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, conforme análise univariada e múltipla.	40
Tabela 8 - Fatores prognósticos para sobrevida livre de doença em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, em análise univariada e múltipla.	43
Tabela 9 - Análise univariada e múltipla dos fatores associados com recidiva hepática em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.	46
Tabela 10 - Coeficiente de concordância entre os métodos AE1/AE3 e hematoxilina e eosina no diagnóstico dos brotamentos tumorais e grupamentos pouco diferenciados nas metástases de câncer colorretal ressecadas.	47
Tabela 11 - Associação entre brotamentos tumorais e as variáveis clínicas e patológicas, em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.	49
Tabela 12 - Associação entre grupamentos pouco diferenciados e as variáveis clínicas e patológicas, em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

et al.	e outros
máx.	máximo
mín.	mínimo

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
μ m	micrômetros
N0	linfonodos negativos no tumor primário
N+	linfonodos positivos no tumor primário
R0	margens cirúrgicas livres de neoplasia
R1	margens cirúrgicas comprometidas por neoplasia
ng/dL	nano grama por decilitro
®	marca registrada
x	vezes
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
≤	menor ou igual
=	igual

LISTA DE SIGLAS

BT	Brotamento(s) tumoral(is)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CCR	Câncer colorretal
DP	Desvio padrão
EP	Erro padrão
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GPD	Grupamentos pouco diferenciados
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e eosina
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC95%	Intervalos de 95% de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHQ	Imuno-histoquímica
IMC	Índice de massa corporal
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MHCCR	Metástase(s) hepática(s) de câncer colorretal
NA	Não avaliável
OR	<i>Odds ratio</i>
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i> (captura eletrônica de dados em pesquisa)
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TNM	Estadiamento tumoral, conforme tumor primário (T), linfonodos comprometidos (N) e metástases à distância (M)
UICC	União Internacional de Controle do Câncer

RESUMO

Fonseca GM. *A importância prognóstica dos grupamentos pouco diferenciados e brotamentos tumorais nas metástases hepáticas do câncer colorretal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: A ressecção hepática é o único tratamento potencialmente curativo para as metástases hepáticas de câncer colorretal (MHCCR), porém com taxas de recidiva entre 60 e 70%. Desta forma, faz-se necessário um melhor entendimento das vias de disseminação e recidiva da doença. Os brotamentos tumorais (BT) e grupamentos pouco diferenciados (GPD), relacionados à transição epitélio-mesenquimal, são fatores prognósticos para o câncer colorretal; entretanto sua presença e importância nas MHCCR ainda não estão estabelecidas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a presença dos BT e GPD nas MHCCR, determinar sua importância prognóstica e sua relação com outros fatores patológicos conhecidos. **MÉTODOS:** Foram avaliados, retrospectivamente, 229 pacientes submetidos a ressecção de MHCCR com intuito curativo, entre janeiro de 2004 e junho de 2014. Nos espécimes cirúrgicos das MHCCR ressecadas, foi realizada análise anatomopatológica através de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE), para avaliação dos BT, GPD, infiltrado inflamatório peritumoral, presença de pseudocápsula e tipo de borda; e por imuno-histoquímica, por meio de anticorpos anti-AE1/AE (BT e GPD), anti-D2-40 (invasão linfática) e anti-CD34 (invasão venosa portal). Também foram analisadas as variáveis clínicas relacionadas ao prognóstico. **RESULTADOS:** O seguimento médio após a hepatectomia foi de 43 meses. As taxas de sobrevida global e livre de doença em 1, 3 e 5 anos foram de, respectivamente, 94,1%, 66,7% e 45,5% e 53,6%, 31,5% e 29,6%. Os BT estiveram presentes em 61,1% dos pacientes na avaliação pelo AE1/AE3 e em 48,9% pelo HE, enquanto os GPD estiveram presentes em 42,8% dos pacientes na avaliação pelo AE1/AE3 e em 49,3%

pelo HE. Na análise univariada, os BT e os GPD grau 3 (>9 GPD) mostraram significância prognóstica, tanto na avaliação pelo AE1/AE3 quanto pelo HE. Na análise múltipla, os fatores independentes para sobrevida global foram: a presença de GPD grau 3 (pelo HE), presença de pseudocápsula, invasão venosa portal e presença de 4 ou mais nódulos. Os fatores independentes para sobrevida livre de doença foram: GPD grau 3 (pelo HE), quimioterapia prévia, presença de 4 ou mais nódulos, infiltrado inflamatório peritumoral ausente ou leve, invasão venosa portal e borda infiltrativa. Os BT e GPD não estiveram associados à recidiva hepática. Os BT foram associados a: GPD, MHCCR sincrônicas, tumores de até 5 cm, ausência de pseudocápsula, borda infiltrativa, e presença de invasão venosa portal. Os GPD foram associados a: BT, infiltrado inflamatório peritumoral ausente ou leve, ausência de pseudocápsula e borda infiltrativa. CONCLUSÕES: Os BT e os GPD são frequentes nas MHCCR e ambos, na análise univariada, são fatores de pior prognóstico na sobrevida global e livre de doença, estando associados à recidiva extra-hepática. A presença de GPD grau 3 avaliada pelo HE é fator prognóstico independente na sobrevida global e livre de doença, sugerindo que este é um importante mecanismo de disseminação tumoral na MHCCR.

Descritores: neoplasias colorretais; metástase neoplásica; fígado; hepatectomia; patologia cirúrgica; prognóstico.

SUMMARY

Fonseca GM. *The prognostic impact of poorly differentiated clusters and tumor budding in colorectal liver metastases* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: The only potentially curative treatment for colorectal liver metastases is surgical resection. However, about 60 to 70% of patients will recur, showing the necessity of a better knowledge regarding spread and disease recurrence pathways. Tumor budding and poorly differentiated clusters, markers related to epithelial-mesenchymal transition, are prognostic factors for colorectal cancer, but their presence and significance in colorectal liver metastases is not yet established. The aims of this study were to evaluate the presence of tumor budding and poorly differentiated clusters in colorectal liver metastases, to determine their prognostic value and to relate them to other known pathological factors. **METHODS:** A total of 229 patients that underwent hepatic resection for colorectal liver metastases between January 2004 and June 2014 were retrospectively evaluated. Resected specimens of colorectal liver metastases were submitted to pathological evaluation by hematoxylin and eosin staining, to analyze tumor budding, poorly differentiated clusters, peritumoral inflammatory infiltrate, presence of tumor pseudocapsule and tumor growth pattern; and by immunohistochemical staining with antibodies anti-AE1/AE3 (tumor budding and poorly differentiated clusters), anti-D2-40 (lymphatic invasion) and anti-CD-34 (portal vein invasion). Clinical variables related to prognosis were also evaluated. **RESULTS:** Mean follow up after hepatectomy was 43 months. Overall and disease-free survival rates at 1, 3 and 5 years were 94.1%, 66.7% and 45.5% and 53.6%, 31.5% and 29.6%, respectively. Tumor budding was present in 61.1% of patients in the evaluation by AE1/AE3 staining and in 48.9% by hematoxylin and eosin, while poorly differentiated clusters were present in 42.8% of patients by AE1/AE3 staining

and 49.3% by hematoxilin and eosin. At univariate analysis, tumor budding and poorly differentiated clusters grade 3 (>9 poorly differentiated clusters) by AE1/AE3 and hematoxilin and eosin staining showed prognostic significance. On multiple analysis, independent factors for overall survival were: presence of poorly differentiated clusters grade 3 (by hematoxilin and eosin), presence of tumor pseudocapsule, portal vein invasion and presence of 4 or more nodules. Independent factors for disease-free survival were: poorly differentiated clusters grade 3 (by hematoxilin and eosin), preoperative chemotherapy, portal vein invasion, presence of 4 or more nodules, none/mild peritumoral inflammatory infiltrate and infiltrative tumor border. Tumor budding and poorly differentiated clusters were not related to hepatic recurrence. Tumor budding was associated with: presence of poorly differentiated clusters, synchronous colorectal liver metastases, tumor size up to 5 cm, absence of tumor pseudocapsule, infiltrative tumor border and presence of portal vein invasion. Poorly differentiated clusters were associated with: presence of tumor budding, none/mild peritumoral inflammatory infiltrate, absence of tumor pseudocapsule and infiltrative tumor border. CONCLUSIONS: Tumor budding and poorly differentiated clusters are frequent in colorectal liver metastases and, on univariate analysis, are prognostic factors for overall and disease-free survival, being associated to extrahepatic recurrence. Presence of poorly differentiated clusters grade 3 stained by hematoxilin and eosin is an independent prognostic factor for overall and disease-free survival, suggesting that it is an important spread pathway in colorectal liver metastases.

Descriptors: colorectal neoplasms; neoplasm metastasis; liver; hepatectomy; pathology, surgical; prognosis.

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tipo de câncer mais comum em homens (746.000 casos novos/ano, 10,1% do total) e o segundo em mulheres (614.000 casos novos/ano, 9,2% do total) em todo o mundo, com incidência estimada de 1.360.000 casos em 2012. O sexo masculino apresenta maior incidência na maioria das populações, independente do padrão geográfico. Quase 55% dos casos ocorrem nas regiões mais desenvolvidas do mundo. É a quarta causa de mortalidade mundial por câncer (693 mil mortes/ano, 8,5% do total), com mais mortes (52%) nas regiões menos desenvolvidas¹.

No Brasil, estima-se para 2018 cerca de 17.380 casos novos de CCR em homens e 18.980 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 16,83 casos novos/ 100 mil homens e 17,90/ 100 mil mulheres. Excluídos os tumores de pele não melanoma, o CCR é o segundo mais frequente na região Sudeste em homens e mulheres (respectivamente 23,29/ 100.000 habitantes e 23,86/ 100.000 habitantes)².

A maioria dos casos de CCR ocorre de modo esporádico (70 a 85%)³. A sobrevida global (SG) do CCR em 5 anos é de cerca de 65%. Quando estratificados de acordo com o estadiamento tumoral, os pacientes com doença restrita ao cólon têm SG de 90% após a ressecção; naqueles com doença acometendo até linfonodos regionais, a SG cai para 70%; e, nos pacientes com metástases à distância, esta é de apenas 13%⁴. Portanto, há necessidade de um olhar mais profundo para este grupo de pacientes com prognóstico restrito, no sentido de melhor compreensão da doença.

O fígado é o local mais frequente de metástases hematogênicas no CCR⁵. Cerca de 40 a 50% dos pacientes com CCR apresentam metástases hepáticas (MHCCR) em algum momento de sua evolução e até metade destes apresentam MHCCR detectáveis ao diagnóstico do tumor primário^{6,7}. Em pacientes com MHCCR não tratadas, a sobrevida média é de 6 meses e,

embora haja relatos de sobrevida a longo prazo, virtualmente todos pacientes sem tratamento falecem dentro de 24 meses após o diagnóstico^{5,8,9}.

O primeiro estudo controlado, embora retrospectivo, a mostrar um real benefício nas ressecções de MHCCR foi publicado em 1976 por Wilson e Adson¹⁰, onde 60 pacientes submetidos à ressecção de MHCCR foram comparados a outros 60 pacientes com MHCCR, com extensão e número de lesões similares, comprovadas histologicamente por biópsia e não operados. A ressecção hepática foi associada a SG em 5 anos e 10 anos de, respectivamente, 25% e 19%, enquanto nenhum dos pacientes não operados estava vivo após 5 anos. Nos anos seguintes, outros estudos corroboraram o benefício desta modalidade terapêutica no tratamento das MHCCR^{8,9,11,12}.

A perspectiva para pacientes com MHCCR tem melhorado significativamente nos últimos anos. Kopetz et al.¹³, em um estudo retrospectivo analisando 2.470 pacientes com MHCCR tratados entre os anos de 1990 e 2006, mostrou que a mediana de SG aumentou de 14 meses, nos pacientes diagnosticados entre 1990 e 1997, para 29 meses, naqueles diagnosticados entre 2004 e 2006. Já a SG em 5 anos aumentou de 9,1% no primeiro período para 19,2% no período de 2001 a 2003. Tal melhora foi atribuída à utilização de novos agentes quimioterápicos e ao aumento no número de ressecções hepáticas. Enquanto nos primeiros anos do estudo cerca 6% dos pacientes com MHCCR foram submetidos à ressecção hepática, no último período, a taxa de ressecção aumentou para 20%.

O crescimento no número de ressecções hepáticas identificado por Kopetz et al.¹³ é multifatorial: é o resultado de uma melhor seleção de pacientes; da evolução dos métodos de diagnóstico por imagem, que permitiram melhor seleção e planejamento pré-operatório; do refinamento das técnicas anestésicas e de cuidados pós-operatórios; da melhoria das estratégias operatórias, como controle dos pedículos portais e das veias hepáticas, melhores técnicas de secção do parênquima, embolização portal e hepatectomias em 2 tempos; da expansão dos critérios de ressecabilidade; e do conceito de quimioterapia neoadjuvante, que permite avaliar a resposta tumoral aos quimioterápicos e, em alguns casos, a diminuição do tamanho do tumor, muitas vezes tornando casos inicialmente considerados irressecáveis

em ressecáveis¹⁴⁻¹⁹. Tais avanços permitem ressecções com taxas de mortalidade perioperatória entre de até 3%^{14,20-22} e, através da abordagem multidisciplinar, a sobrevida em 5 anos pode variar de 35% a 60% em centros de referência^{15,17,23-26}.

Atualmente, a associação entre cirurgia e quimioterapia é o padrão-ouro no tratamento das MHCCR²⁷. Entretanto, apesar de todo avanço no diagnóstico, estadiamento, estratégias cirúrgicas e quimioterapia, cerca de 60% a 70% dos pacientes com MHCCR submetidos a ressecção cirúrgica desenvolverão recidiva da doença^{28,29}.

Neste momento, surgem alguns questionamentos: por que alguns pacientes têm recidiva tumoral e outros não? Quais são os fatores que predispõem à recidiva? O que faz um tumor ser mais ou menos agressivo? A avaliação anatomopatológica tem dado algumas respostas neste sentido, como veremos adiante.

1.1 Critérios prognósticos anatomopatológicos

O papel do patologista é prover ao médico assistente um relatório histopatológico com informações que permitam a melhor decisão terapêutica³⁰. Segundo a União Internacional de Controle do Câncer (UICC)³¹, são considerados fatores prognósticos “essenciais” nos relatórios para o CCR: estadiamento TNM (invasividade do tumor/ linfonodos acometidos/ presença de metástase à distância) e presença de invasão linfática e venosa. Outros são considerados fatores prognósticos “adicionais”, como grau de diferenciação tumoral, brotamentos tumorais (BT), configuração da borda tumoral, invasão perineural, tipo medular, perfuração, infiltrado inflamatório e instabilidade de microsatélite^{30,32,33}.

Nos últimos anos, tem-se tentado identificar fatores anatomopatológicos que se correlacionem com prognóstico não apenas no tumor primário, mas também nas MHCCR, dado o potencial da metástase hepática levar à disseminação tumoral por diversos mecanismos³⁴⁻³⁸. O Serviço de Cirurgia do

Fígado e Hipertensão Portal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) desenvolve uma linha de pesquisa no sentido de compreender os mecanismos intra-hepáticos de disseminação tumoral e sua importância prognóstica³⁹⁻⁴⁶.

A seguir, descreveremos alguns fatores histológicos intra-hepáticos aos quais se tem atribuído importância prognóstica nas MHCCR.

1.1.1 Fatores prognósticos anatomopatológicos intra-hepáticos

O tumor hepático metastático pode se disseminar para o próprio fígado ou órgãos extra-hepáticos por diferentes vias: através de vasos sanguíneos (veia porta ou veia hepática), vasos linfáticos, ductos biliares e nervos³⁸.

A invasão linfática intra-hepática na MHCCR tem sido considerada por alguns autores um fator prognóstico negativo, tanto na avaliação pela hematoxilina e eosina (HE)³⁶ quanto pelo D2-40^{37,41,47}. Entretanto, outros, como Higashi et al.⁴⁸ e Gomez et al.⁴⁹ não demonstraram a invasão linfática intra-hepática como fator prognóstico.

A invasão vascular hepática pode ocorrer através de ramos da veia porta ou das veias hepáticas³⁶ e os resultados quanto ao impacto prognóstico são conflituosos. Enquanto alguns estudos demonstraram a invasão vascular na MHCCR como fator prognóstico^{34,48}, outros estudos não encontraram importância prognóstica^{36,41,47,49,50-52}.

A ideia de que a presença de uma pseudocápsula fibrosa pudesse ter algum efeito sobre o prognóstico em pacientes com MHCCR ressecadas veio do conceito do carcinoma hepatocelular, onde sua presença é associada a um prognóstico mais favorável⁵³. Da mesma forma, a presença de pseudocápsula fibrosa em MHCCR tem sido associada a um prognóstico mais favorável por diversos autores^{34,35,47,54-59}.

Não há consenso sobre como classificar o padrão de crescimento tumoral. Entretanto, o método mais simples, reprodutível e com impacto prognóstico é o descrito por Jass et al.⁶⁰, em que a borda do CCR é

classificada como de aspecto infiltrativo, quando tem crescimento tumoral com projeções dissecando o parênquima não tumoral adjacente, ou expansivo, quando a borda tumoral é plana e o parênquima não tumoral adjacente parece ser comprimido por seu crescimento. Nas MHCCR, a borda infiltrativa tem sido considerada fator de pior prognóstico na SG^{44,58} e sobrevida livre de doença (SLD)⁶¹ e também fator de risco para recidiva hepática após ressecção^{44,61}.

A presença de infiltrado inflamatório peritumoral tem sido relacionada com prognóstico em diversos tumores, como pulmão⁶², mama⁶³, trato gênito-urinário⁶⁴, estômago⁶⁵, colorretal⁶⁶⁻⁶⁸, entre outros. Nas MHCCR, a presença de infiltrado inflamatório ou de células como CD4+, também tem sido associada a um melhor prognóstico^{52,58,69,70}.

1.2 A transição epitélio-mesenquimal e a disseminação tumoral

O fenômeno da transição epitélio-mesenquimal (TEM) é aquele que permite a uma célula polarizada assumir fenótipo mesenquimal, aumentando sua capacidade migratória, invasividade, resistência à apoptose e produção de moléculas da matriz extracelular^{32,71} (Figura 1). As evidências acumuladas sugerem que tal fenômeno desempenhe papel fundamental no desenvolvimento de tumores em geral⁷². Duas formas de expressão fenotípica histológica da TEM são os brotamentos tumorais (BT) e os grupamentos pouco diferenciados (GPD). A seguir, discutiremos sobre a importância destas expressões fenotípicas no CCR e nas MHCCR.

FONTE: Adaptado com permissão de Samarasinghe B⁷³, 2013.

Figura 1 - Principais alterações da transição epitélio-mesenquimal (TEM), que permitem às células epiteliais adquirirem fenótipo mesenquimal e contribuir para maior invasividade tumoral.

1.2.1 Brotamentos tumorais

Brotamento tumoral (BT) é a presença de células neoplásicas individuais ou grupos com menos de 5 células destacadas além da borda tumoral^{74,75}. O mecanismo dos BT parece ser atravessar o tecido conectivo peritumoral para atingir os tecidos adjacentes, evitando as defesas do hospedeiro e invadindo os vasos linfáticos e sanguíneos, com consequentes metástases locais e à distância³⁰. O processo do BT tem sido ligado à TEM⁷⁶.

O primeiro passo do BT parece ser seu destacamento do corpo tumoral através da perda da expressão da E-caderina, uma molécula de adesão na membrana celular³⁰. A ativação da via de sinalização Wnt é adicionalmente

implicada por uma evidente expressão de beta-catenina dentro do núcleo ao invés de no citoplasma ou na membrana das células dos BT, bem como aumento da laminina-5-gama-2 e ativação de SLUG e ZEB1^{30,77}.

O BT foi descrito primeiramente por Imai⁷⁸ em 1954, que postulou que a presença de “brotos” (do inglês, "*sprouting*") na borda invasiva dos carcinomas refletia maior velocidade no crescimento tumoral. O termo "brotamento tumoral" (do inglês, "*tumor budding*") foi definido em 1989 por Morodomi et al.⁷⁹, que assim o descreveram pois os grupos de células pareciam “brotar” das glândulas neoplásicas maiores. Desde então, foi postulada sua importância prognóstica em diversos tipos de tumores, como câncer de pulmão⁸⁰, da ampola de Vater⁸¹, de pâncreas⁸², do esôfago e junção esofagogástrica⁸³, e, principalmente, no CCR^{84,85}.

Um estudo fundamental para demonstrar a importância dos BT no CCR foi conduzido por Hase et al.⁸⁴ no início dos anos 1990. Foram analisados 663 pacientes com CCR e demonstrou-se que a presença de BT estava relacionada a pior prognóstico. Os pacientes com estadiamento Dukes B, quando apresentavam BT, tinham prognóstico similar ou pior ao dos pacientes Dukes C sem BT.

Outros estudos se sucederam e, hoje, a presença de BT no CCR é considerada preditor independente de positividade linfonodal em pacientes com tumor que invade a submucosa⁸⁶⁻⁹¹. Além disto, também é preditor de invasão venosa e linfática⁹². A presença de BT é associada com um risco aumentado de metástases à distância^{32,93,94}, reforçando sua associação com invasão vascular. Entretanto, apesar de estatisticamente significativa, tal associação parece ser menos pronunciada do que a invasão linfática e a metástase linfonodal^{32,79,95,96}. A frequência de BT aumenta quanto mais avançado é o estadiamento TNM⁸⁴ e a sua presença é fator de pior prognóstico, independente do estadiamento patológico^{30,68,97-100}. Rogers et al.⁸⁵, em recente metanálise com 7821 pacientes e 34 estudos, corroboraram tais conceitos, mostrando que a presença de BT em pacientes com CCR esteve associada a comprometimento linfonodal, maior recidiva tumoral e maior probabilidade de óbito relacionado ao câncer em 5 anos.

Apesar de grande número de estudos ter demonstrado a importância dos BT no CCR, as metodologias empregadas são muito diversas. Enquanto alguns estudos avaliam subjetivamente áreas com maior quantidade de BT, outros se propõem a calcular uma média da contagem de BT ao longo da borda invasiva do tumor³². Tais achados sugerem que, a despeito da falta de um sistema padronizado de classificação, BT é marcador fidedigno de progressão tumoral e pior prognóstico, independentemente do sistema de avaliação utilizado³⁰. Embora o Colégio Americano de Patologistas não inclua os BT na lista de características relatáveis no CCR, a *Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology* e a UICC recomendam sua inclusão rotineira nos relatórios anatomopatológicos^{31,101,102}.

Há diversos métodos de classificação dos BT. Os principais são os de Hase⁸⁴ (avalia o padrão predominante de BT na borda invasiva, podendo ser ausente/leve ou moderado/intenso), Nakamura¹⁰³ (avalia-se a proporção da borda invasiva com presença de BT), Ueno⁷⁴ (considerada negativa se houver < 5 BT e positiva se ≥ 5 BT em magnificação de 200x no campo de maior concentração de BT), Wang⁹² (contados os BT em 5 campos de 200x) e outros métodos quantitativos¹⁰⁴ (número total de BT é contado em 1 ou 10 campos com magnificação de 200x).

Desde o ano de 2005, a imuno-histoquímica (IHQ) tem sido utilizada para facilitar a avaliação dos BT no CCR. Prall et al.¹⁰⁵ foi o primeiro a usar uma pancitoqueratina para marcar os BT na borda invasiva. Outros estudos demonstraram um aumento na detecção dos BT com utilização da IHQ quando comparado ao HE, com maior impacto prognóstico¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

1.2.2 Grupamentos pouco diferenciados

De acordo com a definição original de Ueno et al.¹⁰⁹, grupamentos pouco diferenciados (GPD) são grupos tumorais compostos de 5 ou mais células ainda sem formar uma estrutura glandular. Postula-se que os BT e os GPD, dada sua morfologia similar e sua presença na mesma massa neoplásica, sejam passos sequenciais no crescimento tumoral, um mesmo espectro de fatores histológicos associados à desdiferenciação, tendo correlação com a TEM^{110,111}. Os GPD representariam a evolução dos BT, à medida que eles adquirem capacidade proliferativa e agregadora¹¹¹. Assim como os BT, têm sido associados com aumento da regulação das vias de sinalização Wnt/beta-catenina, como metaloproteinases, desintegrina, molécula de adesão à célula L1 e beta-catenina, bem como à perda de proteínas de adesão, como E-caderina e claudina^{71,111-115}.

No CCR, os GPD têm sido associados à presença de invasão linfática e metástase linfonodal, estando mais relacionados à presença de linfonodos comprometidos do que outros tradicionais fatores histológicos prognósticos^{90,99,116-119}. Sua presença também foi associada a maior profundidade de invasão tumoral em tumores precoces (pT1)^{91,116}. Têm sido demonstrados como marcadores prognósticos após ressecção do CCR, independentemente do estadiamento e de outros fatores histológicos prognósticos bem estabelecidos^{109,116-118,120}.

Os GPD têm sido classificados de modo semi-quantitativo em 3 graus, contados na área de maior concentração com lente objetiva de 20x: grau 1 quando o número de grupamentos é ≤ 4 ; grau 2 quando é de 5-9 e grau 3 quando é ≥ 10 ¹⁰⁹.

1.3 Justificativa

Apesar de vários trabalhos terem avaliado os BT e GPD e seu impacto quanto a um pior prognóstico no CCR primário, não há, até o momento, estudos avaliando a presença ou a importância prognóstica dos GPD nas MHCCR e apenas um estudo analisou a presença de BT nas MHCCR⁵⁰. É importante, portanto, o estudo dos BT e dos GPD nas MHCCR em busca de novos critérios patológicos prognósticos e para um melhor entendimento dos mecanismos de disseminação tumoral intra-hepáticos.

2 OBJETIVOS

Em relação à análise anatomopatológica das MHCCR ressecadas com intenção curativa, nosso objetivo primário é avaliar:

- A. A presença de BT e GPD;
- B. Se a presença/ quantificação de BT e GPD representam fator prognóstico de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD), bem como fator de risco para recidiva hepática.

Nosso objetivo secundário é avaliar:

- C. A concordância na avaliação dos BT e GPD através das colorações de HE e AE1/AE3 e seus respectivos impactos prognósticos;
- D. A associação entre a presença dos BT e GPD e outros fatores prognósticos clínicos e patológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo, analítico, baseado na revisão de prontuários e avaliação histológica de peças cirúrgicas dos pacientes submetidos a ressecção de MHCCR com intenção curativa no Serviço de Cirurgia do Fígado e Hipertensão Portal no HCFMUSP e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), no período entre janeiro de 2004 e junho de 2014.

3.1 Casuística

Foi realizada pesquisa em bancos de dados e listas de cirurgias realizadas no HCFMUSP e no ICESSP, com o objetivo de identificar os pacientes submetidos a hepatectomia para o tratamento de MHCCR no período proposto. Em seguida, foram avaliados prontuários médicos e coletados dados pré-operatórios, do procedimento cirúrgico e de seguimento pós-operatório. Os dados clínicos foram armazenados em banco de dados eletrônico (REDCap - *Research Electronic Data Capture*¹²¹), hospedado no servidor do HCFMUSP.

3.2 Aprovação na CAPPesq e fonte de financiamento

O projeto foi aprovado em 17/09/2014 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – do HCFMUSP, com o parecer número 795.985.

O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2015/06551-4.

3.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos todos os pacientes com MHCCR submetidos a hepatectomia com intenção curativa durante o período de estudo, cuja neoplasia primária foi ressecada previamente ou sincronicamente, e não submetidos previamente a quaisquer outros tratamentos cirúrgicos para metástases intra ou extra-hepáticas.

A ressecabilidade dos tumores foi determinada através de exames de imagem pré-operatórios, como tomografia computadorizada, ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada com emissão de pósitrons, e dos achados intra-operatórios. Todos os casos foram discutidos em reunião multidisciplinar antes da indicação cirúrgica. Seguindo os critérios do consenso da *Americas Hepato-Pancreato-Biliary Association*¹²², as metástases hepáticas foram considerados ressecáveis quando existiu: a) possibilidade de preservar volume hepático residual de 20-25% do volume hepático total estimado nos pacientes com fígado normal, ou de 30-40% nos pacientes submetidos à quimioterapia neoadjuvante; b) capacidade de preservar aporte sanguíneo (arterial e portal) e drenagem venosa adequados ao fígado remanescente; c) capacidade de preservar drenagem biliar satisfatória; d) possibilidade de ressecção com margens macroscópicas negativas; e e) ausência de metástases extra-hepáticas irressecáveis (ou não controladas).

3.4 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes com as seguintes características:

- ressecção macroscópica incompleta (R2);
- pacientes que morreram em decorrência de complicações pós-operatórias, até 90 dias do procedimento cirúrgico;
- pacientes com resposta patológica completa do tumor após quimioterapia neoadjuvante;

- impossibilidade de acesso a lâminas e/ou blocos de parafina para revisão anatomopatológica.

3.5 Características clínicas

Foram estudadas as seguintes variáveis de cada paciente:

- sexo;
- idade;
- índice de massa corporal (IMC);
- localização do tumor primário;
- estadiamento TNM da lesão primária, conforme orientações da UICC³¹;
- data do diagnóstico da metástase hepática (considerada sincrônica quando até 12 meses após o diagnóstico da neoplasia primária e metacrônica após este período);
- número de nódulos identificados (considerado multinodular quando 4 ou mais nódulos);
- tamanho do maior nódulo, em centímetros;
- bilobaridade das lesões hepáticas;
- presença de doença extra-hepática;
- dosagem sérica pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA);
- realização de quimioterapia anteriormente à hepatectomia;
- tipo de hepatectomia, maior ou menor (hepatectomia maior foi definida como qualquer ressecção de 3 ou mais segmentos hepáticos¹²³);
- hepatectomia em 1 ou 2 tempos (em casos de hepatectomia em 2 tempos, foi considerada a data do 2º tempo);
- utilização de método ablativo por radiofrequência concomitante à ressecção hepática;
- transfusão sanguínea durante ou até 24 horas após a intervenção;
- presença e gravidade de complicações pós-operatórias;
- tempo de internação hospitalar.

3.6 Avaliação anatomopatológica

Todos os casos selecionados para análise foram submetidos a revisão, por patologista experiente (Dra. Sheila F. Faraj), das lâminas coradas por HE confeccionadas na ocasião da hepatectomia. As lâminas foram obtidas junto ao arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HCFMUSP e do ICESP; quando não foi possível a obtenção das lâminas originais, novos cortes foram realizados nos blocos de parafina referentes àquele caso.

Na avaliação das margens cirúrgicas, foi avaliada a menor distância entre a borda tumoral e a superfície de secção do parênquima hepático, sendo considerada microscopicamente comprometida (R1) quando o tumor estava em contato com a margem cirúrgica, e livre (R0) quando maior do que 1mm; distâncias menores ou iguais à 1 mm foram consideradas exíguas, mas livres de neoplasia.

O número de metástases hepáticas de cada paciente foi determinado através dos exames de imagem pré-operatórios e do exame macroscópico do espécime cirúrgico. As lesões separadas da lesão principal de maior volume distando menos de 1cm desta, chamadas de lesões satélites, não foram contabilizadas, assim como descrito por Taylor et al.¹²⁴. Nos pacientes com múltiplos nódulos, foi escolhida a maior lesão^{37,125} e esta utilizada para avaliação IHQ.

Usando o critério acima, foi selecionado 1 bloco de parafina por paciente. Para os casos em que havia mais que 1 bloco disponível do maior nódulo, foi selecionado o bloco com maior interface entre o tumor e o parênquima hepático. Em cada bloco selecionado, foram realizados 4 cortes seriados de 4 μ m de espessura. As lâminas com os cortes foram então coradas por IHQ, conforme protocolo do Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14), utilizando como polímero o Novolink (Leica Biosystems) e obedecendo à seguinte ordem:

- o primeiro corte para coloração com HE;
- o segundo corte para o anticorpo monoclonal AE1/AE3 (Dako, título 1/800), citoqueratina específica para células epiteliais;

- o terceiro corte para o anticorpo monoclonal D2-40 (Dako, título 1/400), específico para coloração de vasos linfáticos; e
- o quarto corte para o anticorpo monoclonal CD34 (Dako, título 1/500), específico para coloração de vasos sanguíneos.

Com as lâminas prontas, a mesma patologista, de modo cego para os dados clínicos, na presença do doutorando, realizou todas as avaliações conforme descrito abaixo. Os dados anatomopatológicos também foram armazenados em banco de dados eletrônico, mas em local diferente do banco de dados clínicos, para não influenciar a avaliação.

3.6.1 Brotamentos tumorais

A avaliação dos BT foi realizada inicialmente nas lâminas coradas por HE. Foram considerados BT a presença de células neoplásicas individuais ou grupos com menos de 5 células destacadas além da borda tumoral (Figura 3). A avaliação dos BT foi realizada através dos seguintes métodos:

- Hase⁸⁴ – método qualitativo, sendo avaliado o padrão predominante de BT na borda invasiva, classificado em ausente, leve, moderado e intenso, conforme critério subjetivo do patologista;
- Nakamura¹⁰³ – método qualitativo, sendo avaliada a proporção da borda invasiva com presença de BT, conforme a seguinte classificação: ausente, leve (<1/3 da borda invasiva acometida), moderado (1/3 a 2/3 da borda invasiva acometida), e intenso (>2/3 da borda invasiva acometida).
- Avaliação quantitativa¹⁰⁴ – foi selecionada a região de maior densidade de BT e, então, contado o número total de BT em 10 campos de grande aumento sequenciais (400x).

A Figura 2 ilustra os métodos utilizados para avaliação.

Após análise de todas as lâminas coradas com HE, em outro momento, foi feita a avaliação dos BT nas lâminas com IHQ por AE1/AE3 (Figura 4) utilizando a mesma padronização descrita acima, para comparar a capacidade de identificar os BT por ambos os métodos.

FONTE: Adaptado com permissão do *British Journal of Cancer*, de Lugli et al.³⁰, 2012.

Figura 2 - Ilustração das classificações dos brotamentos tumorais, conforme Hase⁸⁴ (A), Nakamura¹⁰³ (B) e método quantitativo, com contagem em 10 campos de grande aumento¹⁰⁴ (C).

3.6.2 Grupamentos pouco diferenciados

A avaliação dos GPD foi realizada inicialmente nas lâminas coradas por HE. Foram considerados GPD quando houve a presença de grupamentos de 5 ou mais células tumorais sem formar uma estrutura glandular¹⁰⁹, no estroma ou na borda tumoral (Figura 5). Em casos de tumores mucinosos, grupamentos de células tumorais com estas características infiltrando o estroma com mínima formação de mucina extracelular foram classificados como GPD, enquanto grupos de células tumorais dentro de grandes lagos de mucina não foram classificados como GPD, conforme designado por Ueno¹¹⁰. Para quantificar os GPD, foi realizada avaliação de todo o tumor, incluindo sua borda, na lâmina do bloco previamente selecionado. Na área com maior densidade de GPD, estes foram contados microscopicamente em 1 campo com aumento de 20x.

Após avaliação de todas as lâminas coradas com HE, em outro momento, foi feita a avaliação dos GPD nas lâminas com IHQ por AE1/AE3 (Figura 6) utilizando a mesma padronização descrita acima, para comparar a capacidade de identificar os GPD por ambos os métodos.

3.6.3 Invasão linfática intra-hepática

A invasão linfática intra-hepática foi avaliada nas lâminas coradas pelo D2-40. Foi considerada positiva quando houve presença de células isoladas ou grupos de células tumorais no interior das estruturas revestidas por endotélio com imunorreatividade ao D2-40 (Figura 7).

3.6.4 Invasão venosa portal intra-hepática

A invasão venosa portal intra-hepática foi avaliada nas lâminas coradas pelo CD34. Foi considerada positiva quando houve presença de células isoladas ou aglomerados de células tumorais no interior das estruturas revestidas por endotélio com imunorreatividade ao CD34, próximas ou similares à tráfide portal e na borda tumoral (Figura 8).

3.6.5 Outras avaliações com coloração por hematoxilina e eosina

Além da avaliação dos BT e dos GPD, foram avaliados os seguintes fatores através da coloração por HE:

- Infiltrado inflamatório peritumoral – presença de linfócitos na periferia do tumor (Figura 9). Classificado em ausente, leve, moderado e acentuado, conforme critério subjetivo do patologista.
- Presença de pseudocápsula tumoral (fibrose peritumoral) – presente quando houve identificação de pseudocápsula fibrosa entre o tumor e o parênquima hepático adjacente (Figura 9). Tal pseudocápsula foi classificada em fina ou espessa, de acordo com critério subjetivo do patologista.
- Tipo de borda tumoral – foi utilizada a classificação de Jass et al.⁶⁰ para o CCR, sendo considerada borda infiltrativa quando houve crescimento tumoral com projeções dissecando o parênquima não tumoral adjacente (Figura 10), e borda expansiva quando a borda tumoral foi plana e o parênquima não tumoral adjacente pareceu ser comprimido por seu crescimento (Figura 9).

Figura 3 - Brotamentos tumorais (setas) identificados através de coloração por hematoxilina e eosina (40x).

Figura 4 - Brotamentos tumorais (cabeças de seta) realçados por imunohistoquímica para AE1/AE3 (40x).

Figura 5 - Grupamentos pouco diferenciados (setas) identificados na coloração por hematoxilina e eosina (20x).

Figura 6 - Grupamentos pouco diferenciados (setas) realçados por imunohistoquímica com AE1/AE3 (20x).

Figura 7 - Invasão linfática, caracterizada por células tumorais (seta) em espaços revestidos por células endoteliais com imunorreatividade para D2-40 (20x).

Figura 8 - Invasão venosa portal, caracterizada por células tumorais (seta) vistas em espaços revestidos por células endoteliais dos vasos sanguíneos marcadas por CD34 (20x).

Figura 9 - Borda expansiva com fibrose peritumoral acentuada (pseudocápsula espessa) e infiltrado inflamatório peritumoral moderado, na coloração por hematoxilina e eosina. Há crescimento tumoral expandindo o parênquima hepático, sem infiltração do mesmo. Observa-se tecido fibrótico na interface entre o tumor e o parênquima adjacente representado por numerosos feixes de colágeno (5x), circundado por infiltrado inflamatório moderado (setas).

Figura 10 - Padrão de borda tumoral infiltrativa vista na coloração por hematoxilina e eosina, caracterizada por crescimento tumoral com projeções dissecando o parênquima hepático adjacente (10x).

3.7 Seguimento

Os pacientes foram seguidos de maneira regular conforme protocolo do Serviço de Cirurgia do Fígado e Hipertensão Portal do HCFMUSP, que consiste de exame físico, coleta de marcadores tumorais (CEA) e realização de exames de imagem a cada 4-6 meses. Os critérios utilizados para definir recidiva da doença basearam-se em: confirmação histológica ou evidência radiológica de evolução do tumor com posterior progressão clínica ou elevação dos marcadores tumorais. O sítio da recidiva foi considerado o(s) primeiro(s) órgão(ões) a apresentar sinais de doença. Foi considerada recidiva intra-hepática quando lesões hepáticas “de novo” foram identificadas na presença ou não de outros sítios de recidiva durante os primeiros sinais de recidiva da doença. Na análise de sobrevida, considerou-se como SG o tempo entre a data da cirurgia e o óbito ou última informação do paciente; aqueles pacientes vivos ou com perda do acompanhamento foram considerados como censurados. Para a SLD, foi considerado o tempo entre a data da cirurgia e a data da recidiva ou do óbito; aqueles pacientes vivos sem recidiva até o último contato foram considerados como censurados.

3.8 Análise estatística

As variáveis qualitativas foram apresentadas pelas suas frequências e porcentagens, enquanto as variáveis quantitativas foram apresentadas pela média, mediana, desvio padrão (DP) e valores mínimo e máximo. As curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação das curvas foi feita pelo teste *log-rank*.

O modelo de regressão de Cox univariado e múltiplo foi desenvolvido para avaliar os fatores prognósticos, tanto para a SG quanto para a SLD. Foram calculados os valores de *hazard ratio* (HR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%).

O método de construção dos modelos de regressão de Cox e regressão logística foi o passo a passo com seleção pra trás (do inglês, "*stepwise backward*"), onde as variáveis candidatas foram aquelas que resultaram com valor de $p < 0,20$ na análise univariada. No modelo final, permaneceram aquelas variáveis com valor de $p < 0,05$ e as variáveis de interesse (BT e GPD).

O teste qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher foi utilizado na avaliação das variáveis relacionadas à recidiva hepática e na associação dos BT e GPD com as outras variáveis clínicas e patológicas. Posteriormente, o modelo de regressão logística univariado e múltiplo foi utilizado para avaliar os fatores preditores de recidiva hepática, com o cálculo dos valores de *odds ratio* (OR) e seus respectivos IC95%.

A concordância entre os métodos AE1/AE3 e HE nos BT e nos GPD foi calculada pelo coeficiente de concordância kappa (κ); quanto mais próximo a 1 o seu valor, maior a concordância entre os métodos.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes de hipóteses. As análises foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 18.0 para Windows®.

4 RESULTADOS

4.1 População avaliada

Foram identificados 293 pacientes submetidos a hepatectomia por MHCCR no período estudado. Destes, foram excluídos: 7 pacientes devido a ressecção macroscópica incompleta (ressecção R2 ou paciente não completou 2º tempo da hepatectomia), 12 pacientes devido a óbito por complicações pós-operatórias (até 90 dias do procedimento cirúrgico); 14 pacientes por resposta patológica completa; e 31 pacientes devido a impossibilidade de acesso aos materiais para revisão anatomopatológica, resultando em um total de 229 casos estudados (Figura 11).

Figura 11 - População estudada.

4.2 Características clínicas da população estudada

As principais características clínicas estão resumidas na Tabela 1. Por se tratar de um trabalho retrospectivo, com período de estudo longo, e por muitos pacientes virem referenciados de outros hospitais para nossa instituição, não foi possível recuperar dados do estadiamento T e N do tumor primário, respectivamente, em 15 (6,6%) e 17 pacientes (7,4%). Em 2 destes casos, o estadiamento N foi considerado desconhecido devido a linfadenectomia inadequada na cirurgia para tratamento do tumor primário, com apenas 1 linfonodo representado. Em 6 pacientes (2,7%) não foi possível identificar se o paciente realizou ou não quimioterapia pré-operatória e em 9 pacientes (3,9%) não foi possível recuperar o resultado do CEA pré-operatório.

Dos treze pacientes (5,7%) com doença extra-hepática ao diagnóstico da MHCCR, as mesmas estavam localizadas nos seguintes sítios: pulmão (7 pacientes), peritônio (5 pacientes) e ovário (1 paciente). Todos estes pacientes tiveram as metástases extra-hepáticas ressecadas durante ou após a ressecção da MHCCR.

Cento e trinta pacientes (56,8%) foram operados no HCFMUSP e 99 pacientes (43,2%) no ICESP. Foram realizadas ressecções anatômicas em 92 pacientes (40,2%), não anatômicas em 68 casos (29,7%) e associação de anatômicas e não anatômicas em outros 69 casos (30,1%). Em 6 pacientes (2,6%) foi realizada ressecção sincrônica do tumor primário e das metástases hepáticas. Houve necessidade de ressecção hepática estagiada, em 2 tempos, em 14 pacientes (6,1%). Cento e nove pacientes (47,6%) foram submetidos a ressecção hepática maior. As cirurgias realizadas, por ordem decrescente de frequência, foram as seguintes: hepatectomia direita (72 pacientes), ressecções não regradas, também chamadas de nodulectomias (69), hepatectomia esquerda (27), monosegmentectomia regradada (16), bissegmentectomia 2-3 (15), bissegmentectomia 6-7 (11), hepatectomia central (6), trissectomia direita (5), outras bissegmentectomias regradas (4), outras trissegmentectomias regradas (3) e trissectomia esquerda (1).

No pós-operatório da hepatectomia, os pacientes permaneceram internados entre 2 e 71 dias, com tempo médio de internação de 9,2 dias

(mediana de 7 dias). As complicações pós-operatórias, conforme a classificação de Dindo-Clavien¹²⁶ foram as seguintes: 0 = 145 pacientes (63,3%); 1 = 28 pacientes (12,2%); 2 = 26 pacientes (11,4%); 3 = 27 pacientes (11,8%) e 4 = 3 pacientes (1,3%) .

Os pacientes tiveram seguimento médio de 43 meses, com mediana de 37,3 meses, variando de 2 a 154 meses. Cento e cinquenta e seis pacientes estudados apresentaram recidiva (68,1%) durante o período de acompanhamento. Dos pacientes que apresentaram recidiva, a mesma ocorreu entre 1 e 86 meses após a ressecção hepática, com média de 11,2 meses e mediana de 8,1 meses. A recidiva ocorreu nos primeiros 24 meses após ressecção hepática em 91% dos pacientes. O primeiro sítio de recidiva ocorreu exclusivamente no fígado em 44 pacientes (28,2%); em 35 pacientes (22,4%), a recidiva foi hepática e extra-hepática; já em 77 pacientes (49,4%), o primeiro sítio de recidiva foi extra-hepático. O tempo médio de SLD da casuística foi de 50,79 meses, com mediana de 13,04 meses, e a SLD em 1, 3 e 5 anos foi de, respectivamente 53,6%, 31,5% e 29,6% (Figura 12B).

O tempo médio de SG da casuística foi de 83,6 meses, com mediana de 55,9 meses, e a SG em 1, 3 e 5 anos foi de, respectivamente, 94,1%, 66,7% e 45,5% (Figura 12A)

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes submetidos a ressecção de metástases hepáticas de câncer colorretal.

Característica		n (%)
		n = 229
<i>Idade na cirurgia</i>	Até 60 anos	103 (45,0)
	Mais de 60 anos	126 (55,0)
	Média (DP)	60,18 (11,16)
<i>Sexo</i>	Feminino	96 (41,9)
	Masculino	133 (58,1)
<i>IMC (kg/m²)</i>	Média (DP)	26,08 (4,00)
	Mediana (mín. - máx.)	25,65 (17,01-39,04)
<i>Local da neoplasia primária</i>	Cólon	132 (57,6)
	Reto	97 (42,4)
<i>Aparecimento da MHCCR</i>	Metacrônica	74 (32,3)
	Sincrônica	155 (67,7)
<i>Classificação T¹</i>	T1/T2	13 (6,1)
	T3/T4	201 (93,9)
<i>Classificação N²</i>	N0 (linfonodos negativos)	89 (42,0)
	N+ (linfonodos positivos)	123 (58,0)
<i>CEA pré-operatório (em ng/dL)³</i>	Média (DP)	103,97 (448,20)
	Mediana (mín. - máx.)	10,9 (0,30-6.058)
<i>Doença extra-hepática</i>	Não	216 (94,3)
	Sim	13 (5,7)
<i>Bilobaridade</i>	Não	158 (69,0)
	Sim	71 (31,0)
<i>Tamanho do maior nódulo (em cm)</i>	Até 5cm	178 (77,7)
	Mais de 5cm	51 (22,3)
	Média (DP)	3,98 (2,96)
	Mediana (mín. - máx.)	3 (0,4-23,5)
<i>Número de nódulos</i>	1 nódulo	113 (49,3)
	2 a 3 nódulos	64 (27,9)
	4 ou mais nódulos	52 (22,7)
<i>Quimioterapia prévia⁴</i>	Não	78 (35,0)
	Sim	145 (65,0)

<i>Hemotransfusão</i>	Não	172 (75,1)
	Sim	57 (24,9)
<i>Terapia ablativa associada</i>	Não	213 (93,0)
	Sim	16 (7,0)

DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corporal; MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal; CEA: antígeno carcinoembrionário; cm: centímetros; mín.: valor mínimo; máx.: valor máximo. ¹ 15 casos sem informação do T; ² 17 casos sem informação de N; ³ 9 casos sem informação de CEA; ⁴ 6 casos sem informação de quimioterapia prévia

Figura 12 - Curvas de sobrevida global (A) e de sobrevida livre de doença (B) dos pacientes submetidos a ressecção de metástases hepáticas de câncer colorretal.

4.3 Características anatomopatológicas da população estudada

As Tabelas 2 e 3 resumem as características dos BT e dos GPD nas MHCCR, respectivamente. Os BT foram avaliados através da coloração por HE e AE1/AE3, de acordo com as classificações de Hase, Nakamura e avaliação quantitativa em 10 campos de grande aumento. Os GPD estiveram presentes em 42,8% dos pacientes na avaliação pelo AE1/AE3 e em 49,3% pelo HE. A Tabela 4 resume as demais características patológicas avaliadas nas MHCCR.

Tabela 2 - Características dos brotamentos tumorais (BT) nas metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.

Característica		n (%)
		n = 229
<i>BT - quantitativo (AE1/AE3)</i>	Média (DP)	4,13 (6,27)
	Mediana (mín. - máx.)	3,00 (0-54)
<i>BT - Hase (AE1/AE3)</i>	Ausente	89 (38,9)
	Leve	106 (46,3)
	Moderado	26 (11,4)
	Intenso	8 (3,5)
<i>BT - Nakamura (AE1/AE3)</i>	Ausente	89 (38,9)
	Leve (<1/3 da borda)	108 (47,2)
	Moderado (1/3-2/3 da borda)	25 (10,9)
	Intenso (>2/3 da borda)	7 (3,1)
<i>BT - quantitativo (HE)</i>	Média (DP)	2,06 (3,04)
	Mediana (mín. - máx.)	0 (0-19)
<i>BT - Hase (HE)</i>	Ausente	117 (51,1)
	Leve	99 (43,2)
	Moderado	9 (3,9)
	Intenso	4 (1,7)
<i>BT - Nakamura (HE)</i>	Ausente	117 (51,1)
	Leve (<1/3 da borda)	101 (44,1)
	Moderado (1/3-2/3 da borda)	10 (4,4)
	Intenso (>2/3 da borda)	1 (0,4)

DP: desvio padrão; HE: hematoxilina e eosina; AE1/AE3: método de imuno-histoquímica; BT: brotamentos tumorais; Hase: avaliação subjetiva da quantidade de brotamentos tumorais na borda do tumor; Nakamura: avaliação subjetiva de quanto da borda tumoral possui brotamentos tumorais; mín.: valor mínimo; máx.: valor máximo.

Tabela 3 - Características dos grupamentos pouco diferenciados (GPD) nas metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.

Característica		n (%)
		n = 229
<i>GPD (AE1/AE3)</i>	Média (DP)	2,49 (3,66)
	Mediana (mín. - máx.)	0 (0-20)
	Grau 1 (até 4)	178 (77,7)
	Grau 2 (5-9)	39 (17,0)
	Grau 3 (10 ou mais)	12 (5,3)
<i>GPD (HE)</i>	Média (DP)	2,71 (3,56)
	Mediana (mín. - máx.)	2 (0-20)
	Grau 1 (até 4)	172 (75,1)
	Grau 2 (5-9)	46 (20,1)
	Grau 3 (10 ou mais)	11 (4,8)

DP: desvio padrão; HE: hematoxilina e eosina; AE1/AE3: método de imuno-histoquímica; GPD: grupamentos pouco diferenciados; mín.: valor mínimo; máx.: valor máximo.

Tabela 4 - Características de outras variáveis patológicas avaliadas nas metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.

Característica		n (%)
		n = 229
<i>Infiltrado inflamatório peritumoral</i>	Ausente/leve	164 (71,6)
	Moderada/acentuada	65 (28,4)
<i>Fibrose peritumoral (pseudocápsula)</i>	Ausente	172 (75,1)
	Presente espessa	25 (10,9)
	Presente fina	32 (14,0)
<i>Tipo de borda</i>	Expansiva	60 (26,2)
	Infiltrativa	169 (73,8)
<i>Invasão venosa portal</i>	Não	159 (69,4)
	Sim	70 (30,6)
<i>Invasão linfática</i>	Não	191 (83,4)
	Sim	38 (16,6)
<i>Margens livres</i>	Não	32 (14,0)
	Sim	197 (86,0)

4.4 Variáveis clínicas e anatomopatológicas e sobrevida global

Na avaliação dos BT pelos diferentes métodos, as curvas de SG não tiveram diferença estatisticamente significativa pelas classificações originais de Hase⁸⁴ e Nakamura¹⁰³, tanto utilizando o HE quanto o AE1/AE3. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa nas curvas de SG quando foram agrupados conforme a presença ou ausência dos BT, tanto pelo AE1/AE3 ($p=0,03$) quanto pelo HE ($p=0,029$). A análise quantitativa dos BT por ambas as colorações também não demonstrou impacto no prognóstico. A Tabela 5 resume a SG de acordo com a presença dos BT e as Figuras 13A e 13B demonstram a diferença estatisticamente significativa das curvas em gráficos.

Tabela 5 - Sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, segundo a presença de brotamentos tumorais.

Sobrevida	Média (EP) (meses)	Mediana (meses)	12 meses	36 meses	60 meses	Valor de p¹
<i>Hase (AE1/AE3)</i>						0,166
Ausente	97,35 (7,77)	NA	94,1%	72,1%	58,6%	
Leve	66,28 (5,24)	45,18	93,2%	61,1%	37,4%	
Moderado	64,46 (9,20)	49,74	96,0%	69,2%	35,6%	
Intenso	70,42 (17,19)	58,15	100%	75,0%	40,0%	
<i>Nakamura (AE1/AE3)</i>						0,142
Ausente	97,35 (7,77)	NA	94,1%	72,1%	58,6%	
<1/3 da borda	65,74 (5,20)	45,18	93,3%	60,3%	36,8%	
1/3-2/3 da borda	64,25 (8,86)	56,90	95,8%	74,2%	42,1%	
>2/3 da borda	71,88 (21,71)	58,15	100%	71,4%	26,8%	
<i>AE1/AE3</i>						0,030
Ausente	97,35 (7,77)	NA	94,1%	72,1%	58,6%	
Presente	73,35 (5,93)	49,74	94,1%	63,4%	37,2%	
<i>Hase (HE)</i>						0,098
Ausente	94,95 (7,16)	87,29	92,8%	74,0%	56,0%	
Leve	67,00 (5,16)	49,48	95,9%	62,8%	36,7%	
Moderado	56,79 (12,10)	49,91	100%	51,9%	38,9%	
Intenso	31,62 (9,09)	21,85	75%	25,0%	25,0%	
<i>Nakamura (HE)</i>						0,100
Ausente	94,95 (7,16)	87,29	92,8%	74,0%	56,0%	
<1/3 da borda	66,76 (5,11)	49,48	96,0%	62,2%	36,4%	
1/3-2/3 da borda	53,86 (12,17)	35,75	90,0%	50,0%	40,0%	
>2/3 da borda	32,66 (0)	32,66	0	0	0	
<i>HE</i>						0,029
Ausente	94,95 (7,16)	87,29	92,8%	74,0%	56,0%	
Presente	64,52 (4,90)	49,48	95,4%	60,4%	36,7%	

EP: erro padrão; NA: não avaliável; AE1/AE3: método de imuno-histoquímica; HE: hematoxilina e eosina; Hase: avaliação subjetiva da quantidade de brotamentos tumorais na borda do tumor; Nakamura: avaliação subjetiva de quanto da borda tumoral possui brotamentos tumorais. ¹ Valor de p do teste *Log-rank*.

Na avaliação dos GPD pelos diferentes métodos, as curvas de sobrevida tiveram diferença estatisticamente significativa, tanto pelo AE1/AE3 ($p=0,036$) quanto pelo HE ($p=0,005$), principalmente no grupo de pacientes classificados como Grau 3 (10 ou mais GPD). A Tabela 6 resume a SG conforme a presença dos GPD e as Figuras 13C e 13D demonstram a diferença estatisticamente significativa de tais curvas em gráfico.

Tabela 6 - Sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal, segundo presença de grupamentos pouco diferenciados.

Sobrevida	Média (EP) (meses)	Mediana (meses)	12 meses	36 meses	60 meses	Valor de p¹
AE1/AE3						0,036
Grau 1 (até 4)	85,89 (5,64)	56,90	93,6%	69,1%	48,0%	
Grau 2 (5-9)	65,78 (6,80)	54,24	97,3%	68,4%	42,9%	
Grau 3 (10 ou mais)	37,32 (7,86)	30,19	91,7%	29,2%	19,4%	
HE						0,005
Grau 1 (até 4)	88,04 (5,83)	59,11	94,0%	72,1%	49,8%	
Grau 2 (5-9)	70,15 (8,07)	54,24	93,3%	56,9%	38,5%	
Grau 3 (10 ou mais)	34,99 (8,45)	21,85	100%	22,2%	11,1%	

EP: erro padrão; AE1/AE3: método de imuno-histoquímica; HE: hematoxilina e eosina. ¹ Valor de p do teste *Log-rank*.

A) BT (AE1/AE3)

B) BT (HE)

C) GPD (AE1/AE3)

D) GPD (HE)

Figura 13 - Curvas de sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, conforme a presença de brotamentos tumorais (BT) pelo AE1/AE3 (A) e pela hematoxilina e eosina (HE) (B) e conforme a presença dos grupamentos pouco diferenciados (GPD) pelo AE1/AE3 (C) e hematoxilina e eosina (D).

No estudo dos fatores prognósticos relacionados à SG em pacientes com MHCCR submetidos a ressecção com intuito curativo, os fatores associados a pior prognóstico na análise univariada foram: presença de linfonodos positivos no tumor primário, nível de CEA > 20ng/dL, margem R1, tamanho do maior nódulo > 5cm, número de nódulos ≥ 4 , necessidade de hemotransfusão, presença de BT e presença de GPD (ambos pelo AE1/AE3 e HE), infiltrado inflamatório peritumoral ausente/leve, ausência de pseudocápsula, tipo de borda infiltrativa e presença de invasão venosa portal.

Na análise múltipla, os fatores prognósticos independentes associados a pior SG foram: presença de GPD (HE) grau 3, presença de invasão venosa portal e presença de 4 ou mais nódulos. A presença de fibrose peritumoral (pseudocápsula) não foi fator prognóstico independente associado a melhor SG. A presença de BT não interferiu no prognóstico de forma independente. A Tabela 7 resume os fatores clínicos e patológicos associados à SG em análise univariada e múltipla, com seus respectivos HR, IC95% e valor de p.

Tabela 7 - Fatores prognósticos para sobrevida global em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, conforme análise univariada e múltipla.

Característica		Análise univariada		Análise múltipla	
		HR não ajustado (IC95%)	Valor de p	HR ajustado (IC95%)	Valor de p ¹
Idade	Até 60 anos	1,00		NS	-
	Mais de 60 anos	1,22 (0,82-1,82)	0,333		
Sexo	Feminino	1,00		NS	-
	Masculino	1,18 (0,79-1,77)	0,421		
IMC	kg/m ²	0,99 (0,95-1,04)	0,781	NS	-
Local da neoplasia primária	Cólon	1,00		NS	-
	Reto	1,32 (0,89-1,96)	0,167		
Aparecimento da MHCCR	Metacrônica	1,00		NS	-
	Sincrônica	0,86 (0,57-1,31)	0,483		
Classificação T	T1/T2	1,00		NS	-
	T3/T4	0,92 (0,37-2,27)	0,859		
Classificação N	N0	1,00		NS	-
	N+	1,80 (1,16-2,81)	0,009		
CEA pré-operatório	≤20 ng/dL	1,00		NS	-
	>20 ng/dL	2,09 (1,40-3,11)	<0,001		
Doença extra-hepática	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,80 (0,87-3,72)	0,114		
Margens livres	Não	1,00		NS	-
	Sim	0,59 (0,36-0,98)	0,040		
Bilobaridade	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,19 (0,78-1,81)	0,428		
Tamanho do maior nódulo	Até 5cm	1,00		NS	-
	Mais de 5cm	1,59 (1,03-2,47)	0,037		
Número de nódulos	1 nódulo	1,00		1	
	2 a 3 nódulos	1,15 (0,71-1,85)	0,573	1,34 (0,81-2,21)	0,254
	4 ou mais nódulos	1,90 (1,19-3,05)	0,008	2,21 (1,35-3,61)	0,002
Quimioterapia prévia	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,34 (0,87-2,07)	0,180		
Hemotransusão	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,96 (1,29-2,96)	0,001		
Terapia ablativa associada	Não	1,00		NS	-
	Sim	0,48 (0,18-1,31)	0,152		
BT quantitativo (AE1/AE3)		1,01 (0,98-1,03)	0,618	NS	-
BT (AE1/AE3)	Ausente	1,00		NS	-
	Presente	1,60 (1,04-2,45)	0,031		
BT quantitativo (HE)		1,03 (0,98-1,10)	0,254	NS	-
BT (HE)	Ausente	1,00		1	
	Presente	1,56 (1,04-2,33)	0,030	0,93 (0,58-1,50)	0,777
GPD (AE1/AE3)	Grau 1 (≤4)	1,00		NS	-
	Grau 2 (5-9)	1,04 (0,61-1,76)	0,888		
	Grau 3 (≥10)	2,41 (1,21-4,84)	0,013		

<i>GPD (HE)</i>	Grau 1 (≤ 4)	1,00		1	
	Grau 2 (5-9)	1,33 (0,84-2,12)	0,228	1,11 (0,68-1,83)	0,678
	Grau 3 (≥ 10)	3,10 (1,48-6,47)	0,003	2,91 (1,34-6,32)	0,007
<i>Infiltrado inflamatório peritumoral</i>	Ausente/leve	1,00		NS	-
	Moderada/acentuada	0,61 (0,38-0,99)	0,043		
<i>Fibrose peritumoral (pseudocápsula)</i>	Ausente	1,00		1	
	Presente espessa	0,35 (0,15-0,81)	0,014	0,47 (0,20-1,15)	0,098
	Presente fina	0,31 (0,14-0,67)	0,003	0,33 (0,15-0,73)	0,006
<i>Tipo de borda</i>	Expansiva	1,00		NS	-
	Infiltrativa	3,03 (1,72-5,35)	<0,001		
<i>Invasão venosa portal</i>	Não	1,00		1	
	Sim	1,68 (1,13-2,52)	0,011	1,89 (1,22-2,95)	0,005
<i>Invasão linfática</i>	Ausente	1,00		NS	-
	Presente	1,03 (0,60-1,76)	0,917		

HR: *hazard ratio*; IC95%: Intervalo de confiança de 95%; IMC: índice de massa corporal; MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal; CEA: antígeno carcinoembrionário; BT: brotamentos tumorais; GPD: grupamentos pouco diferenciados; AE1/AE3: método imuno-histoquímico; HE: hematoxilina e eosina; N0: linfonodos negativos; N+:linfonodos positivos; ¹ Valor de p da regressão de Cox ajustada.

4.5 Variáveis clínicas e anatomopatológicas e sobrevida livre de doença

No estudo dos fatores prognósticos relacionados à SLD em pacientes com MHCCR submetidos a ressecção com intuito curativo, os fatores associados a pior prognóstico, na análise univariada, foram: presença de linfonodos positivos no tumor primário, níveis de CEA > 20ng/dL, margem R1, presença de nódulos bilobares, número de nódulos ≥ 4 , quimioterapia prévia, necessidade de hemotransfusão, presença de BT e presença de GPD (ambos pelo AE1/AE3 e HE), infiltrado inflamatório peritumoral ausente/leve, ausência de pseudocápsula, tipo de borda infiltrativa e invasão venosa portal.

Na análise múltipla, os fatores relacionados de forma independente com pior SLD foram: GPD (HE) grau 3, quimioterapia prévia, presença de 4 ou mais nódulos, infiltrado inflamatório peritumoral ausente, presença de invasão venosa portal e borda tipo infiltrativa. A Tabela 8 resume os fatores clínicos e patológicos associados à SLD em análise univariada e múltipla, com seus respectivos HR, IC95% e valor de p.

Tabela 8 - Fatores prognósticos para sobrevida livre de doença em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas, em análise univariada e múltipla.

Característica		Análise univariada		Análise múltipla	
		HR não ajustado (IC95%)	Valor de p	HR ajustado (IC95%)	Valor de p ¹
<i>Idade</i>	Até 60 anos	1,00		NS	-
	Mais de 60 anos	0,88 (0,64-1,21)	0,425		
<i>Sexo</i>	Feminino	1,00		NS	-
	Masculino	0,85 (0,62-1,16)	0,298		
<i>IMC</i>	kg/m ²	1,00 (0,96-1,04)	0,969	NS	-
<i>Local da neoplasia primária</i>	Cólon	1,00		NS	-
	Reto	1,24 (0,90-1,70)	0,187		
<i>Aparecimento da MHCCR</i>	Metacrônica	1,00		NS	-
	Sincrônica	1,22 (0,87-1,72)	0,259		
<i>Classificação T</i>	T1/T2	1,00		NS	-
	T3/T4	0,99 (0,52-1,88)	0,971		
<i>Classificação N</i>	N0	1,00		NS	-
	N+	1,60 (1,14-2,25)	0,007		
<i>CEA pré-operatório</i>	≤20 ng/dL	1,00		NS	-
	>20 ng/dL	1,67 (1,22-2,30)	0,002		
<i>Doença extra-hepática</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,20 (0,63-2,28)	0,581		
<i>Margens livres</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	0,56 (0,37-0,85)	0,006		
<i>Bilobaridade</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,69 (1,22-2,35)	0,002		
<i>Tamanho do maior nódulo</i>	Até 5cm	1,00		NS	-
	Mais de 5cm	1,27 (0,88-1,85)	0,208		
<i>Número de nódulos</i>	1 nódulo	1,00		1	
	2 a 3 nódulos	1,15 (0,79-1,69)	0,461	1,05 (0,70-1,56)	0,83
	4 ou mais nódulos	2,35 (1,61-3,44)	<0,001	2,28 (1,49-3,50)	<0,001
<i>Quimioterapia prévia</i>	Não	1,00		1	
	Sim	1,80 (1,26-2,57)	0,001	1,74 (1,19-2,56)	0,005
<i>Hemotransfusão</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,49 (1,05-2,10)	0,025		
<i>Terapia ablativa associada</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	1,14 (0,62-2,11)	0,668		
<i>BT quantitativo (AE1/AE3)</i>		1,01 (0,99-1,03)	0,564	NS	-
<i>BT (AE1/AE3)</i>	Ausente	1,00		NS	-
	Presente	1,54 (1,11-2,16)	0,011		
<i>BT quantitativo (HE)</i>		1,05 (1,00-1,09)	0,063	NS	-
<i>BT (HE)</i>	Ausente	1,00		1	
	Presente	1,67 (1,22-2,30)	0,002	1,02 (0,69-1,51)	0,918
<i>GPD (AE1/AE3)</i>	Grau 1 (≤4)	1,00		NS	-
	Grau 2 (5-9)	1,20 (0,79-1,81)	0,393		
	Grau 3 (≥10)	1,96 (1,05-3,65)	0,034		

<i>GPD (HE)</i>	Grau 1 (≤ 4)	1,00		1	
	Grau 2 (5-9)	1,36 (0,93-1,99)	0,114	1,09 (0,72-1,66)	0,682
	Grau 3 (≥ 10)	2,45 (1,28-4,70)	0,007	2,98 (1,39-6,39)	0,005
<i>Infiltrado inflamatório peritumoral</i>	Ausente/leve	1,00		1	
	Moderada/acentuada	0,52 (0,36-0,76)	0,001	0,52 (0,34-0,78)	0,002
<i>Fibrose peritumoral (pseudocápsula)</i>	Ausente	1,00		NS	-
	Presente espessa	0,48 (0,27-0,84)	0,011		
	Presente fina	0,30 (0,16-0,55)	<0,001		
<i>Tipo de borda</i>	Expansiva	1,00		1	
	Infiltrativa	2,65 (1,73-4,04)	<0,001	1,72 (1,05-2,82)	0,031
<i>Invasão venosa portal</i>	Não	1,00		1	
	Sim	1,41 (1,01-1,97)	0,042	1,68 (1,16-2,43)	0,006
<i>Invasão linfática</i>	Ausente	1,00		NS	-
	Presente	0,95 (0,62-1,43)	0,791		

HR: *hazard ratio*; IC95%: Intervalo de confiança de 95%; IMC: índice de massa corporal; MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal; CEA: antígeno carcinoembrionário; BT: brotamentos tumorais; GPD: grupamentos pouco diferenciados; AE1/AE3: método imuno-histoquímico; HE: hematoxilina e eosina; N0: linfonodos negativos; N+:linfonodos positivos; ¹ Valor de p da regressão de Cox ajustada.

4.6 Fatores associados à recidiva hepática

Na análise univariada dos fatores associados à recidiva hepática, margens comprometidas, presença de nódulos bilaterais, número de nódulos ≥ 4 , hemotransfusão, ausência de pseudocápsula, tipo de borda infiltrativa e presença de invasão venosa portal foram estatisticamente significativos. Os BT e os GPD não estiveram associados à recidiva hepática, mas estiveram associados à recidiva extra-hepática (respectivamente, OR=2,06 IC95%=1,22-3,49 p=0,007 e OR=2,48 IC95% 1,26-4,89 p=0,008).

Na análise múltipla, os fatores associados de modo independente à recidiva hepática foram: número de nódulos ≥ 4 , presença de pseudocápsula fina (fator protetor) e presença de invasão venosa portal. A Tabela 9 resume os fatores clínicos e patológicos associados à recidiva hepática nas análises univariada e múltipla, com seus respectivos OR, IC95% e valor de p.

Tabela 9 - Análise univariada e múltipla dos fatores associados com recidiva hepática em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.

Característica		Análise univariada		Análise múltipla	
		OR não ajustado (IC95%)	Valor de p ¹	OR ajustado (IC95%)	Valor de p ²
<i>BT (AE1/AE3)</i>	Ausente	1,00		NS	-
	Presente	1,61 (0,91-2,85)	0,105		
<i>BT (HE)</i>	Ausente	1,00		1	
	Presente	1,52 (0,88-2,62)	0,137	1,13 (0,59-2,17)	0,719
<i>GPD (AE1/AE3)</i>	Grau 1 (≤ 4)	1,00		NS	-
	Grau 2 (5-9)	1,29 (0,63-2,65)	0,482		
	Grau 3 (≥ 10)	2,07 (0,64-6,69)	0,225		
<i>GPD (HE)</i>	Grau 1 (≤ 4)	1,00		1	
	Grau 2 (5-9)	1,15 (0,59-2,27)	0,682	0,80 (0,38-1,70)	0,561
	Grau 3 (≥ 10)	1,12 (0,32-3,99)	0,858	0,69 (0,17-2,81)	0,608
<i>Margens livres</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	0,35 (0,16-0,75)	0,007		
<i>Bilobaridade</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	2,31 (1,29-4,12)	0,005		
<i>Número de nódulos</i>	1 nódulo	1,00		1	
	2 a 3 nódulos	0,92 (0,46-1,82)	0,802	0,99 (0,48-2,06)	0,987
	4 ou mais nódulos	3,45 (1,74-6,85)	<0,001	4,05 (1,92-8,54)	<0,001
<i>CEA pré-operatório</i>	≤ 20 ng/dL	1,00		NS	-
	>20 ng/dL	1,13 (0,64-1,97)	0,678		
<i>Hemotransusão</i>	Não	1,00		NS	-
	Sim	2,08 (1,13-3,84)	0,020		
<i>Fibrose peritumoral (pseudocápsula)</i>	Ausente	1,00		1	
	Presente espessa	0,27 (0,09-0,80)	0,019	0,36 (0,11-1,21)	0,1
	Presente fina	0,14 (0,04-0,49)	0,002	0,11 (0,03-0,42)	0,001
<i>Tipo de borda</i>	Expansiva	1,00		NS	-
	Infiltrativa	4,01 (1,85-8,67)	<0,001		
<i>Invasão venosa portal</i>	Não	1,00		1	
	Sim	1,84 (1,03-3,29)	0,040	2,09 (1,08-4,03)	0,028
<i>Ajuste do modelo</i> ³	Qui-quadrado		10,16		0,254

OR: *odds ratio*; IC95%: intervalo de confiança 95%; BT: brotamentos tumorais; AE1/AE3: método de imuno-histoquímica; HE: hematoxilina e eosina; GPD: grupamentos pouco diferenciados; CEA: antígeno carcinoembrionário; ¹ Regressão logística; ² Valor de p da regressão logística ajustada; ³ Teste de ajuste do modelo Hosmer-Lemeshow.

4.7 Concordância entre hematoxilina e eosina e AE1/AE3 na avaliação dos brotamentos tumorais e grupamentos pouco diferenciados

A análise de concordância entre o HE e o AE1/AE3 na avaliação dos BT mostrou que houve uma concordância substancial ($\kappa=0,618$) entre os métodos. Já em relação aos GPD, tal concordância foi um pouco menor, porém considerável ($\kappa=0,344$). A Tabela 10 resume estes achados.

Tabela 10 - Coeficiente de concordância entre os métodos AE1/AE3 e hematoxilina e eosina no diagnóstico dos brotamentos tumorais e grupamentos pouco diferenciados nas metástases de câncer colorretal ressecadas.

		BT AE1/AE3		Total	Kappa
		Ausente	Presente		
		n=89	n=140		
BT HE	Ausente	81 (35,4)	36 (15,7)	117	0,618
	Presente	8 (3,5)	104 (45,4)	112	
		GPD AE1/AE3			
		Grau 1	Grau 2	Grau 3	
		n=178	n=39	n=12	
GPD HE	Grau 1	151 (65,9)	17 (7,4)	4 (1,7)	0,344
	Grau 2	23 (10,0)	18 (7,9)	5 (2,2)	
	Grau 3	4 (1,7)	4 (1,7)	3 (1,3)	

BT: brotamentos tumorais; AE1/AE3: método de imuno-histoquímica; HE: hematoxilina e eosina; GPD: grupamentos pouco diferenciados.

4.8 Associação entre os brotamentos tumorais e grupamentos pouco diferenciados e as outras variáveis clínicas e patológicas

Uma vez que a presença de BT e GPD avaliada nas lâminas coradas pelo HE teve maior significado prognóstico, foi avaliada a associação entre a presença dos BT e GPD pelo HE e as outras variáveis clínicas e patológicas.

As variáveis associadas à presença de BT foram: presença de GPD, tumores sincrônicos, tumores de até 5 cm, quimioterapia prévia, ausência de fibrose peritumoral (pseudocápsula), borda infiltrativa, e presença de invasão venosa portal. A Tabela 11 sintetiza a associação dos BT com as outras variáveis estudadas.

As variáveis associadas à presença dos GPD foram: presença de BT, infiltrado inflamatório peritumoral ausente/leve, ausência de fibrose peritumoral (pseudocápsula) e borda infiltrativa. A Tabela 12 sintetiza a associação dos GPD com as outras variáveis estudadas.

Tabela 11 - Associação entre brotamentos tumorais e as variáveis clínicas e patológicas, em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.

Variável		Total	BT		Valor de p ¹
			Ausente	Presente	
			n=117 n (%)	n=112 n(%)	
<i>GPD</i>	Grau 1 (≤ 4)	172	104 (60,5)	68 (39,5)	<0,001
	Grau 2 (5-9)	46	11 (23,9)	35 (76,1)	
	Grau 3 (≥ 10)	11	2 (18,2)	9 (81,8)	
<i>Idade</i>	Até 60 anos	103	47 (45,6)	56 (54,4)	0,135
	Mais de 60 anos	126	70 (55,6)	56 (44,4)	
<i>Sexo</i>	Feminino	96	53 (55,2)	43 (44,8)	0,290
	Masculino	133	64 (48,1)	69 (51,9)	
<i>Local da neoplasia primária</i>	Cólon	132	68 (51,5)	64 (48,5)	0,881
	Reto	97	49 (50,5)	48 (49,5)	
<i>Aparecimento da MHCCR</i>	Metacrônica	74	45 (60,8)	29 (39,2)	0,042
	Sincrônica	155	72 (46,5)	83 (53,5)	
<i>Classificação T</i>	T1/T2	13	7 (53,8)	6 (46,2)	0,775
	T3/T4	201	100 (49,8)	101 (50,2)	
<i>Classificação N</i>	N0	89	51 (57,3)	38 (42,7)	0,070
	N+	123	55 (44,7)	68 (55,3)	
<i>CEA pré-operatório</i>	≤ 20	131	67 (51,1)	64 (48,9)	0,565
	> 20	89	42 (47,2)	47 (52,8)	
<i>Doença extra-hepática</i>	Não	216	110 (50,9)	106 (49,1)	0,838
	Sim	13	7 (53,8)	6 (46,2)	
<i>Margem livre</i>	Não	32	15 (46,9)	17 (53,1)	0,607
	Sim	197	102 (51,8)	95 (48,2)	
<i>Nódulos bilobares</i>	Não	158	84 (53,2)	74 (46,8)	0,349
	Sim	71	33 (46,5)	38 (53,5)	
<i>Tamanho do maior nódulo</i>	Até 5cm	178	84 (47,2)	94 (52,8)	0,027
	Mais de 5cm	51	33 (64,7)	18 (35,3)	
<i>Número de nódulos</i>	1 nódulo	113	59 (52,2)	54 (47,8)	0,310
	2 a 3 nódulos	64	28 (43,8)	36 (56,3)	
	4 ou mais nódulos	52	30 (57,7)	22 (42,3)	
<i>Quimioterapia prévia</i>	Não	78	51 (65,4)	27 (34,6)	0,002
	Sim	145	63 (43,4)	82 (56,6)	
<i>Hemotransfusão</i>	Não	172	88 (51,2)	84 (48,8)	0,970
	Sim	57	29 (50,9)	28 (49,1)	

<i>Terapia ablativa associada</i>	Não	213	107 (50,2)	106 (49,8)	0,344
	Sim	16	10 (62,5)	6 (37,5)	
<i>Infiltrado inflamatório peritumoral</i>	Ausente/leve	164	79 (48,2)	85 (51,8)	0,160
	Moderada/acentuada	65	38 (58,5)	27 (41,5)	
<i>Fibrose peritumoral (pseudocápsula)</i>	Ausente	172	69 (40,1)	103 (59,9)	<0,001
	Presente espessa	25	22 (88,0)	3 (12,0)	
	Presente fina	32	26 (81,3)	6 (18,8)	
<i>Tipo de borda</i>	Expansiva	60	51 (85,0)	9 (15,0)	<0,001
	Infiltrativa	169	66 (39,1)	103 (60,9)	
<i>Invasão venosa portal</i>	Não	159	89 (56,0)	70 (44,0)	0,026
	Sim	70	28 (40,0)	42 (60,0)	
<i>Invasão linfática</i>	Ausente	191	102 (53,4)	89 (46,6)	0,117
	Presente	38	15 (39,5)	23 (60,5)	

BT: brotamentos tumorais; GPD: grupamentos pouco diferenciados; MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal; N0: linfonodos negativos; N+: linfonodos positivos; CEA: antígeno carcinoembrionário. ¹ Teste qui-quadrado de Pearson.

Tabela 12 - Associação entre grupamentos pouco diferenciados e as variáveis clínicas e patológicas, em pacientes com metástases hepáticas de câncer colorretal ressecadas.

Variável		Total	GPD			Valor de p ¹
			Grau 1	Grau 2	Grau 3	
			n=172 n (%)	n=46 n (%)	n=11 n (%)	
<i>BT</i>	Ausente	117	104 (88,9)	11 (9,4)	2 (1,7)	<0,001
	Presente	112	68 (60,7)	35 (31,3)	9 (8,0)	
<i>Idade</i>	Até 60 anos	103	76 (73,8)	23 (22,3)	4 (3,9)	0,656
	Mais de 60 anos	126	96 (76,2)	23 (18,3)	7 (5,6)	
<i>Sexo</i>	Feminino	96	73 (76,0)	18 (18,8)	5 (5,2)	0,895
	Masculino	133	99 (74,4)	28 (21,1)	6 (4,5)	
<i>Local da neoplasia primária</i>	Cólon	132	102 (77,3)	21 (15,9)	9 (6,8)	0,063
	Reto	97	70 (72,2)	25 (25,8)	2 (2,1)	
<i>Aparecimento da MHCCR</i>	Metacrônica	74	55 (74,3)	14 (18,9)	5 (6,8)	0,621
	Sincrônica	155	117 (75,5)	32 (20,6)	6 (3,9)	
<i>Classificação T</i>	T1/T2	13	12 (92,3)	1 (7,7)	0	0,445 ²
	T3/T4	201	149 (74,1)	42 (20,9)	10 (5,0)	
<i>Classificação N</i>	N0	89	71 (79,8)	16 (18,0)	2 (2,2)	0,368
	N+	123	90 (73,2)	26 (21,1)	7 (5,7)	
<i>CEA pré-operatório</i>	≤20	131	103 (78,6)	24 (18,3)	4 (3,1)	0,142
	>20	89	61 (68,5)	21 (23,6)	7 (7,9)	
<i>Doença extra-hepática</i>	Não	216	163 (75,5)	42 (19,4)	11 (5,1)	0,539 ²
	Sim	13	9 (69,2)	4 (30,8)	0	
<i>Margem livre</i>	Não	32	20 (62,5)	10 (31,3)	2 (6,3)	0,196
	Sim	197	152 (77,2)	36 (18,3)	9 (4,6)	
<i>Nódulos bilobares</i>	Não	158	119 (75,3)	30 (19,0)	9 (5,7)	0,561
	Sim	71	53 (74,6)	16 (22,5)	2 (2,8)	
<i>Tamanho do maior nódulo</i>	Até 5cm	178	136 (76,4)	33 (18,5)	9 (5,1)	0,538
	Mais de 5cm	51	36 (70,6)	13 (25,5)	2 (3,9)	
<i>Número de nódulos</i>	1 nódulo	113	84 (74,3)	24 (21,2)	5 (4,4)	0,964
	2 a 3 nódulos	64	48 (75,0)	12 (18,8)	4 (6,3)	
	4 ou mais nódulos	52	40 (76,9)	10 (19,2)	2 (3,8)	
<i>Quimioterapia prévia</i>	Não	78	64 (82,1)	12 (15,4)	2 (2,6)	0,228
	Sim	145	104 (71,7)	34 (23,4)	7 (4,8)	
<i>Hemotransusão</i>	Não	172	135 (78,5)	30 (17,4)	7 (4,1)	0,120
	Sim	57	37 (64,9)	16 (28,1)	4 (7,0)	
<i>Terapia ablativa associada</i>	Não	213	159 (74,6)	43 (20,2)	11 (5,2)	1 ²
	Sim	16	13 (81,3)	3 (18,8)	0	

<i>Infiltrado inflamatório peritumoral</i>	Ausente/leve	164	111 (67,7)	43 (26,2)	10 (6,1)	<0,001
	Moderada/acentuada	65	61 (93,8)	3 (4,6)	1 (1,5)	
<i>Fibrose peritumoral (pseudocápsula)</i>	Ausente	172	117 (68,0)	44 (25,6)	11 (6,4)	0,001
	Presente espessa	25	24 (96,0)	1 (4,0)	0	
	Presente fina	32	31 (96,9)	1 (3,1)	0	
<i>Tipo de borda</i>	Expansiva	60	57 (95,0)	3 (5,0)	0	<0,001
	Infiltrativa	169	115 (68,0)	43 (25,4)	11 (6,5)	
<i>Invasão venosa portal</i>	Não	159	121 (76,1)	32 (20,1)	6 (3,8)	0,544
	Sim	70	51 (72,9)	14 (20,0)	5 (7,1)	
<i>Invasão linfática</i>	Ausente	191	142 (74,3)	39 (20,4)	10 (5,2)	0,741
	Presente	38	30 (78,9)	7 (18,4)	1 (2,6)	

BT: brotamentos tumorais; GPD: grupamentos pouco diferenciados; MHCCR: metástases hepáticas de câncer colorretal; N0: linfonodos negativos; N+: linfonodos positivos; CEA: antígeno carcinoembrionário. ¹ Teste qui-quadrado de Pearson. ² Teste exato de Fisher.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa do Serviço de Cirurgia do Fígado e Hipertensão Portal do HCFMUSP, que, através da avaliação anatomopatológica das MHCCR, busca estudar as vias de disseminação tumoral e novos critérios prognósticos que auxiliem no melhor entendimento desta doença^{39-46,127,128}.

O conceito usado como base para esta avaliação é o de que as células tumorais das MHCCR são capazes de se disseminar para outros locais do fígado ou para diferentes órgãos através de distintas vias^{34,36}, por meio de vasos sanguíneos intra-hepáticos, como ramos da veia porta e das veias hepáticas, vasos linfáticos, ductos biliares e nervos³⁸. Alguns trabalhos têm apoiado a hipótese de que invasões de vasos sanguíneos e linfáticos não sejam apenas duas rotas diferentes para que células metastáticas se disseminem, mas também representem diferentes comportamentos biológicos do tumor, com a metástase linfática potencialmente desempenhando papel primordial na progressão para a circulação sistêmica e órgãos à distância^{42,129}.

Apesar da invasão direta de cada uma destas estruturas ser considerada a principal via de disseminação tumoral, através do conhecimento das alterações na TEM, como descrito previamente, postulamos que a presença de BT ou dos GPD pudesse ser outro mecanismo de disseminação. Com a mudança na polaridade celular, as células adquirem fenótipo mesenquimal, aumentando sua capacidade migratória, invasividade, resistência à apoptose e produção de moléculas da matriz extracelular⁷¹. Assim, atravessam o tecido conectivo peritumoral para atingir os tecidos adjacentes, evitando as defesas do hospedeiro e invadindo os vasos linfáticos e sanguíneos mais distantes, com consequentes metástases locais e à distância³⁰.

Neste estudo, primeiramente procuramos avaliar a ocorrência fenotípica destes fenômenos nas MHCCR e, em seguida, seu significado prognóstico em termos de SG, SLD e recidiva hepática, bem como sua identificação pelos

diferentes métodos (HE e AE1/AE3) e sua associação com outras variáveis clínicas e patológicas.

Este é o primeiro estudo que avalia a presença dos GPD nas MHCCR. Pudemos demonstrar que os GPD estão presentes nas MHCCR e que o grau 3 (≥ 10) é fator prognóstico independente para SG e SLD, sendo um fator prognóstico mais relevante do que os BT. Ueno et al.¹⁰⁹ também demonstraram a superioridade prognóstica dos GPD em relação aos BT no CCR primário.

Os GPD não estiveram associados à recidiva hepática, mas à extra-hepática, mostrando que esta via de disseminação está relacionada a metástases à distância. O achado de que os GPD provavelmente se associam à recidiva extra-hepática corrobora os achados de Ueno et al.¹¹⁰, que estudaram 411 pacientes com MHCCR submetidos a hepatectomia e mostraram que a presença de grande quantidade de GPD no CCR primário foi fator de pior prognóstico, influenciando, em especial, a recidiva extra-hepática no pulmão e peritônio. Entretanto, o exato mecanismo de disseminação tumoral através dos GPD não está completamente compreendido.

No CCR primário, dos fatores patológicos estudados, a presença dos GPD tem sido associada à invasão linfática^{116,120,130-132} e vascular^{120,130} e à presença de borda infiltrativa^{116,131}. No estudo especificamente das MHCCR, os GPD não estiveram associados à invasão vascular ou linfática na borda tumoral, mas à borda do tipo infiltrativo, à ausência de pseudocápsula e à ausência de infiltrado inflamatório peritumoral. A forte associação entre os GPD e a ausência de infiltrado inflamatório peritumoral sugere participação dos mecanismos imunes no controle do tumor e que a ausência de resposta imune facilite a ocorrência dos GPD e a disseminação tumoral. A ausência de associação com invasão linfática e vascular tem duas possíveis explicações. A primeira é que isso possa significar diferentes mecanismos de disseminação dentro do fígado, em relação ao tumor primário. A segunda é que, habitualmente, a invasão linfática no tumor primário é avaliada pela HE, enquanto nossa trabalho avaliou tal invasão pela IHQ, através do AE1/AE3, portanto, com metodologias diferentes empregadas.

A chave para explicar o mecanismo de disseminação dos GPD talvez esteja relacionada às três características morfológicas aos quais estão

associados. Embora a literatura não forneça explicação para tanto, nós postulamos que os tumores com padrão infiltrativo, sem pseudocápsula e sem uma resposta imune do hospedeiro capaz de contê-los facilitem a ocorrência dos GPD e que eles, por sua vez, possam promover disseminação tumoral através de vasos sanguíneos ou linfáticos não exatamente na borda tumoral, mas mais à distância ainda.

Reforçando a hipótese gerada no CCR primário de que os BT e os GPD podem representar passos sequenciais no crescimento tumoral¹¹¹, a presença de um esteve associada à presença do outro em nosso estudo, achados semelhantes aos de Ueno et al.¹⁰⁹ e Barresi et al.¹¹⁶ no tumor primário.

Os GPD são visualizados classicamente pelo HE, com a vantagem de serem mais facilmente reconhecíveis nestas lâminas do que os BT, sem necessidade da IHQ, e têm avaliação menos subjetiva e com menor variação interobservador do que outros fatores histológicos^{110,116,120}. Nós aventamos a hipótese de que a avaliação dos GPD pudesse ser melhor realizada no fígado através da IHQ (AE1/AE3) do que pelo HE. Houve concordância considerável entre os métodos, porém a avaliação pelo HE teve maior significância prognóstica e foi fator prognóstico independente, reforçando o conceito de que o HE é suficiente para o estudo dos GPD.

Os GPD estão presentes não apenas na borda, mas também no estroma do tumor, conferindo outra vantagem no tumor primário, que é a possibilidade de serem avaliados em biópsias endoscópicas^{117,133}. Isto nos leva a um questionamento: seria possível avaliar o comportamento biológico do tumor pré-operatoriamente através da quantificação dos GPD em fragmentos de biópsia por punção da MHCCR?

Do ponto de vista genotípico, no CCR primário, a presença de GPD em grande quantidade foi associada à mutação do KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), especialmente no códon 12 (G12A e G12C) e 13 (G13C e G13D). Estes achados levantam a hipótese de que a mutação do KRAS poderia ser responsável pela formação dos GPD^{111,134}.

Em nosso estudo, os BT mostraram relação com a SG e SLD na análise univariada; entretanto, não se mostraram fatores prognósticos independentes, provavelmente por estarem associados à presença de outros fatores

prognósticos mais significativos, como a presença dos GPD, presença de pseudocápsula, borda infiltrativa e invasão vascular.

Até o momento, Park et al.⁵⁰ haviam sido os únicos a estudar o valor prognóstico dos BT nas MHCCR, não encontrando significância prognóstica. Neste estudo, foram avaliados 117 pacientes através do HE e os BT foram considerados positivos quando houve 10 ou mais focos de <5 células destacados da borda tumoral na microscopia com magnificação de 200x. A positividade dos BT no estudo de Park et al.⁵⁰ foi muito mais alta (81,2%) do que encontramos em nosso estudo (48,8% pelo HE e 61,1% pelo AE1/AE3), o que pode justificar a ausência de significância prognóstica e sugerir que houve diferença conceitual do que foi considerado BT.

É importante ressaltar que, em nosso estudo, não se observou diferença no prognóstico quando foram utilizadas diferentes classificações para avaliar os BT (Hase, Nakamura e o método quantitativo); a diferença prognóstica ocorreu apenas quando agrupamos em presente ou ausente, mostrando que o que vale não é a intensidade do fenômeno, mas a sua ocorrência ou não.

No CCR primário, a avaliação dos BT por IHQ é considerada superior à avaliação pelo HE, com maior positividade na identificação dos mesmos e maior correlação prognóstica^{105,107,108,135}. Por esta razão, avaliamos em nosso estudo os BT utilizando o HE e o AE1/AE3 e houve concordância substancial entre eles. De fato, houve maior positividade no diagnóstico dos BT pelo AE1/AE3 em relação ao HE por todos os métodos, especialmente na avaliação quantitativa. Entretanto, tal diferença não refletiu em maior significado prognóstico, mostrando que não há benefício claro na utilização de métodos de IHQ para avaliação de BT nas MHCCR. Outro questionamento é se os BT vistos no AE1/AE3 são realmente BT ou são falsos positivos do método. Uma vez que não há padrão-ouro, tal hipótese não pode ser confirmada.

Os BT foram associados a tumores sincrônicos, tumores de até 5 cm, realização de quimioterapia prévia, ausência de pseudocápsula, tipo de borda infiltrativa e presença de invasão venosa portal. A associação com invasão venosa portal pode ser explicada pelos possíveis mecanismos de disseminação hematogênica dos BT^{32,92,135}. A associação com a borda infiltrativa também é descrita no CCR primário^{92,104,135}. Como em nosso estudo

a borda infiltrativa esteve intimamente associada à ausência de pseudocápsula, os BT também estiveram. Assim, na MHCCR, tumores infiltrativos e sem pseudocápsula facilitariam a ocorrência dos BT, permitindo a disseminação de células neoplásicas na circulação sistêmica através da invasão vascular na borda tumoral. Em relação à realização de quimioterapia prévia e sincronicidade, podemos estar diante de um viés, uma vez que os pacientes que realizaram quimioterapia antes da cirurgia foram justamente os pacientes com outros critérios estabelecidos de pior prognóstico, como tumores sincrônicos¹³⁶. A associação com tumores de até 5cm pode indicar uma característica dos BT no fígado, uma vez que, no CCR primário, não é descrita associação com o tamanho tumoral.

Assim como os GPD, os BT não estiveram relacionados à recidiva hepática, mas à extra-hepática, mostrando que devem estar associados ao mecanismo de disseminação intravascular, com ocorrência de metástases à distância.

Alguns autores, sem a padronização realizada neste trabalho, avaliaram isoladamente a presença de células tumorais destacadas da borda tumoral, no espaço sinusoidal, denominando-as micrometástases sinusoidais. Yokoyama et al.¹²⁵, usando CK-20, demonstraram que a presença de micrometástases hepáticas foi associada à maior número de metástases hepáticas macroscópicas, maior probabilidade de recorrência intra-hepática e menor sobrevida em 10 anos (64,3% vs. 21,9%). Entretanto, embora houvesse positividade de invasão sinusoidal em 43,5% dos pacientes, a presença de células tumorais no trato portal, que é sinal de invasão vascular, também foi considerada como micrometástase hepática. Korita et al.³⁷ e Lupinacci et al.⁴¹ encontraram invasão sinusoidal, respectivamente em 30% e 38% dos pacientes com MHCCR e a mesma não demonstrou valor prognóstico.

Além dos fatores ligados à TEM, nós também avaliamos outros fatores patológicos de possível impacto no prognóstico, como o infiltrado inflamatório peritumoral, a fibrose peritumoral (pseudocápsula), o tipo de borda tumoral e a presença de invasões portal e a linfática.

Em nosso estudo, a presença de invasão linfática intra-hepática não se associou a pior prognóstico. Estes resultados divergem dos achados de outros

autores que utilizaram D2-40, embora tenhamos usado metodologia semelhante^{37,41,47}. A presença de invasão linfática em nossa casuística foi de 16,6%, semelhante à de Sasaki et al.³⁶ (15,4%) e Korita et al.³⁷ (12,4%), porém bem inferior à encontrada por Lupinacci et al.⁴¹ (29%) e De Ridder et al.⁴⁷ (26,6%). Nossos achados em relação ao prognóstico são semelhantes aos de Hayashi et al.⁴⁸ e Gomez et al.⁴⁹, embora estes tenham utilizado HE para avaliar a invasão linfática intra-hepática. Tal diferença de resultados demonstra que este ainda é um tema controverso.

A relação entre a invasão vascular nas MHCCR e prognóstico é outro assunto ainda controverso na literatura. Dos 10 estudos publicados até o momento que avaliam este tema, apenas 3 demonstraram sua importância prognóstica^{34,35,48}, enquanto os outros 7 não estabeleceram qualquer relação entre sua presença e prognóstico^{36,37,41,47,49,51,52}. Uma revisão com metanálise publicada em 2013 por Knijn et al.³⁸ mostrou que a incidência média de invasão venosa portal nas MHCCR era de 26,2%, semelhante à que encontramos em nosso estudo (30,6%) e que, apesar da pequena amostra e heterogeneidade dos estudos, parecia haver maior SG nos pacientes sem invasão venosa portal.

Das formas de invasão vascular intra-hepática (portal ou de veias hepáticas), nós avaliamos especificamente a invasão venosa portal, que parece ser o mecanismo mais importante na disseminação tumoral. A invasão venosa portal e os GPD foram os únicos fatores patológicos relacionados à SG e SLD nas análises univariada e múltipla. Tais achados reforçam a hipótese de que este é um mecanismo importante de disseminação tumoral. A invasão venosa portal também esteve associada à recidiva hepática nas análises univariada e múltipla. A hipótese de que a invasão venosa portal reflete o grau de agressividade e invasividade do tumor, principalmente no contexto das margens cirúrgicas, já havia sido levantada por outros autores^{137,138}, mas é a primeira vez que se demonstra estatisticamente sua associação com a recidiva hepática após ressecção de MHCCR.

A presença de fibrose peritumoral (pseudocápsula) foi fator de melhor prognóstico na SG (análise univariada e múltipla) e SLD (apenas análise univariada) em nossa casuística. A presença de pseudocápsula também

esteve intimamente associada ao tipo de borda expansiva, o que pode explicar o fato deste fator não ser associado à SLD na análise múltipla.

Nossos achados corroboram a literatura, que mostra a presença de pseudocápsula como fator de melhor prognóstico nas MHCCR^{34,35,47,54-59,70}. A principal hipótese para este achado é que a pseudocápsula deve agir como uma barreira física e química, limitando a expansão e agressividade tumoral. Esta barreira é caracterizada por miofibroblastos que estimulam a produção de colágeno como resposta do hospedeiro, semelhante a uma resposta inflamatória. Tal sequência é secundária a eventos compressivos, inflamatórios e necróticos nas MHCCR, mediados por determinadas populações celulares locais, como as células de Ito⁵⁷. Essa hipótese pode justificar porque os pacientes sem pseudocápsula peritumoral tiveram mais GPD e BT e, portanto, menor capacidade de conter o tumor.

A presença de pseudocápsula teve associação negativa com a recidiva hepática em nosso estudo, nas análises univariada e múltipla. Lunevicius et al.⁵⁷ também demonstraram que pacientes com pseudocápsula peritumoral apresentavam menor recidiva hepática do que aqueles sem pseudocápsula (7,1% versus 35,5%). Okano et al.³⁵ demonstraram que os pacientes cujas MHCCR ressecadas não apresentavam pseudocápsula peritumoral tinham maior incidência de recidiva hepática ou pulmonar (65% versus 24%). Rajaganeshan et al.¹³⁹ encontraram associação entre a borda expansiva no CCR primário e a presença de tumores encapsulados no fígado, tendo este grupo de pacientes melhor SLD do que os com borda infiltrativa.

Em nosso estudo, o tipo de borda infiltrativa foi fator de pior prognóstico na SG (análise univariada), SLD (análise univariada e múltipla) e recidiva hepática (análise univariada). Como esteve associada intimamente à ausência de pseudocápsula, acreditamos que, por isso, não houve significância estatística na análise múltipla da SG e recidiva hepática. Nossos achados estão de acordo com estudos prévios sobre o tipo de borda tumoral na MHCCR. O primeiro estudo a mostrar que a borda infiltrativa era fator prognóstico na SG foi conduzido em 1999 por Nagashima et al.⁵⁸. Yamaguchi et al.⁶¹ demonstraram que o padrão infiltrativo foi preditor de SLD e recidiva intra-hepática após ressecção. Também demonstraram que não houve

evidente correlação entre o tipo de borda do CCR primário e o tipo de borda da MHCCR e que, em um mesmo paciente submetido a repetidas ressecções hepáticas, havia diferentes tipos de borda para cada ressecção, o que sugere que o tumor é capaz de mudar sua morfologia com o tempo e de acordo com tipo de órgão em que se desenvolve. Em nosso Serviço, Pinheiro et al.⁴⁴, encontraram, em análise multivariada, a borda tumoral infiltrativa como fator de risco independente na SG e recidiva intra-hepática, quando comparada com o padrão expansivo (SLD em 5 anos de 20,2% versus 40,5%). Por outro lado, Serrablo et al.¹⁴⁰ não encontraram significância prognóstica do tipo de borda nas MHCCR.

A presença de infiltrado inflamatório peritumoral foi fator de melhor prognóstico na SG (análise univariada) e SLD (análise univariada e múltipla) em nosso estudo. O conceito que nos levou a estudar este fator patológico é o de que há interação imunológica entre o tumor e o hospedeiro. Os mecanismos imunes representam uma resposta específica do hospedeiro contra o tumor e os infiltrados inflamatórios são compostos principalmente de linfócitos T com atividade citotóxica contra as células tumorais autólogas, cuja atividade é máxima na periferia do tumor. Isto sugere haver um papel na resposta imune do hospedeiro em retardar o crescimento tumoral e diminuir o potencial metastático da lesão primária^{67,69}. Outros autores também demonstraram a importância prognóstica do infiltrado inflamatório ou da presença de células de defesa na borda tumoral^{58,69,70}. Tal mecanismo pode justificar a associação do infiltrado peritumoral moderado/ intenso com menor ocorrência de GPD em nossa casuística. Nossos achados abrem novas perspectivas para um aprofundamento do estudo da relação entre a resposta imune do hospedeiro e o tumor, inclusive relacionando-os com os conhecidos mecanismos de disseminação tumoral intra-hepática e outros fatores patológicos

Em nossa casuística, a margem R1 esteve associada a pior SG e SLD e maior risco de recidiva hepática na análise univariada. Tradicionalmente, margens microscopicamente negativas (R0) têm sido consideradas um importante fator prognóstico após ressecção de MHCCR^{20,128,136}. Entretanto, a distância da margem ideal ainda é assunto controverso e, de certa forma, associa-se a outros fatores patológicos. Alguns autores, baseados no conceito

de que 95% de nódulos tumorais microscópicos estão presentes dentro de 1cm da borda tumoral, recomendam que a margem cirúrgica seja de, pelo menos, 1cm^{20,137,141,142}. Dhir et al.¹⁴³ publicaram metanálise com 18 estudos e 4821 pacientes submetidos a ressecção de MHCCR com margens livres e demonstraram que os pacientes com margens maiores do que 1cm tiveram melhor sobrevida em 5 anos do que aqueles com margens menores do que 1cm (46% versus 38%). Entretanto, uma cuidadosa avaliação da metodologia empregada levantou dúvidas sobre a validade dos resultados, em relação à heterogeneidade estatística e clínica dos estudos avaliados^{128,144}.

Nos últimos anos, a abordagem agressiva dos pacientes com nódulos múltiplos e bilobares tornou uma margem de 1 cm difícil de ser alcançada, devido à possibilidade do parênquima hepático remanescente ser insuficiente ou à proximidade do tumor com estruturas vasculares^{44,128}. Pawlik et al.¹⁴⁵, em estudo multicêntrico com 557 pacientes, mostraram que uma margem livre maior do que 1mm não afeta a SG, SLD ou sítio de recidiva. Sadot et al.¹⁴⁶, em estudo recente com 2368 pacientes, encontraram que a mediana da SG nos grupos de pacientes com ressecção R1, margem de 0,1 a 0,9mm, margem de 1 a 9mm e margem maior que 10mm foi de, respectivamente, 32, 40, 53 e 56 meses, demonstrando que margens amplas devem ser tentadas sempre que possível, mas que, quando isso não for viável, margens submilimétricas também se associam a melhor sobrevida.

Uma hipótese que pode justificar tais achados relativos ao tamanho da margem são os mecanismos de invasão na borda tumoral descritos anteriormente. Entretanto, nosso estudo possui duas limitações que inviabilizam tal análise. A primeira é que a distância das margens não foi medida em todos os pacientes, sendo apenas dividida em microscopicamente livres ou comprometidas. Nós também não quantificamos a distância da borda tumoral onde ocorreram os fenômenos, como invasão venosa portal, linfática, BT e GPD, que poderia ajudar a elucidar tais relações. O entendimento destes achados abre portas para posteriores investigações.

A maioria dos autores considera o número de nódulos como importante fator prognóstico^{19,20,44,136,147-151}, inclusive em metanálise¹⁵². Um assunto controverso é o de quantos nódulos metastáticos estão associados a pior

prognóstico: enquanto a maioria dos autores considera 4 ou mais^{20,151,152}, outros consideram mais do que um^{136,147}, dois^{19,44,150} e até mais do que sete lesões¹⁴⁸. Nosso estudo reforçou a importância do número de nódulos como um dos mais importantes fatores prognósticos, sendo fator independente para SG, SLD e recidiva hepática. Também corroborou os achados da maioria dos autores, de que os pacientes com 1, 2 ou 3 nódulos têm prognósticos semelhantes, sendo significativamente pior nos pacientes com 4 ou mais nódulos, o que representa a melhor definição de multinodularidade. Entretanto, apesar de importante fator prognóstico, o número de lesões não deve ser considerado como contra-indicação à ressecção, desde que se obtenha margens microscopicamente livres¹⁴⁹.

O tamanho das metástases hepáticas também é considerado fator prognóstico relevante, sendo incluído em alguns escores prognósticos^{20,136,150}, em especial as lesões maiores que 5cm. Em nosso estudo, o tamanho da maior lesão foi fator prognóstico para SG em análise univariada. Com o emprego de modernos quimioterápicos, por vezes tem sido observada significativa redução no tamanho das lesões, o que sugere que a avaliação do comportamento biológico como resposta à quimioterapia possa ser um marcador prognóstico mais importante do que o tamanho inicial do tumor¹⁴⁹.

O impacto prognóstico da distribuição bilobar dos múltiplos nódulos hepáticos é assunto controverso. Enquanto alguns estudos sugerem ser fator prognóstico relevante^{136,150}, outros não encontraram significância^{20,153}. Em nosso estudo, a presença de nódulos bilaterais, apesar de fator prognóstico na SLD e associado à recidiva hepática na análise univariada, não representou fator prognóstico independente. Acreditamos que a importância prognóstica tenha maior relação com a multinodularidade do que com a bilobaridade.

O aparecimento das metástases hepáticas de modo sincrônico também tem sido considerado fator prognóstico em diversos escores^{20,136,153}. Entretanto alguns outros autores não encontraram associação com pior prognóstico^{24,154}. Em nosso estudo, o surgimento das MHCCR em até 12 meses após a ressecção do tumor primário não foi fator prognóstico.

A presença de linfonodos positivos no CCR primário é outro fator de pior prognóstico após ressecção de MHCCR de acordo com vários autores e

incluída em diferentes escores prognósticos^{20,136,147,153,154}. Em nosso trabalho, a presença de linfonodos positivos no tumor primário foi fator prognóstico na SG e SLD na análise univariada, embora não tenha sido significativa na análise múltipla.

Nível elevado de CEA no pré-operatório também é considerado fator prognóstico após ressecção de MHCCR segundo diversos autores^{20,51,136,151,154-157}. Este também é um marcador de resposta à quimioterapia sistêmica e de recidiva nos pacientes que expressam CEA¹⁴⁹. Nós utilizamos o valor >20 ng/dL pois foi o que apresentou maior impacto prognóstico em nossa casuística, sendo fator prognóstico para SG e SLD na análise univariada.

A presença de doença extra-hepática concomitante também tem sido considerada fator prognóstico relevante na ressecção de MHCCR^{151,155,158}. Em nossa casuística, tal fator não teve significância prognóstica, provavelmente devido a maior seleção dos pacientes com doença extra-hepática submetidos a ressecção hepática e ao fato de pacientes com doença extra-hepática não submetidos a ressecção terem sido excluídos do estudo.

O papel da quimioterapia perioperatória no tratamento das MHCCR é assunto de debate. Portier et al.¹⁵⁹ e Nordlinger et al.¹⁶⁰, em ensaios clínicos randomizados, mostraram que a quimioterapia associada à ressecção hepática em pacientes com MHCCR, quando comparada à cirurgia isoladamente, não influenciou a SG, mas aumentou a SLD. Já Langer et al.¹⁶¹, também em ensaio clínico randomizado, não encontraram benefício na quimioterapia associada a cirurgia quando comparada a cirurgia isolada, tanto na SG quanto na SLD. Araújo et al.¹⁶², em recente metanálise, encontraram benefício na quimioterapia associada a cirurgia na SG e SLD. Na nossa casuística, existe um viés, pois os pacientes submetidos a cirurgia sem quimioterapia foram os pacientes com tumores de melhor prognóstico, preferencialmente lesões únicas, metacrônicas, com CEA baixo, enquanto os pacientes submetidos a quimioterapia foram aqueles com tumores considerados inicialmente mais agressivos. Isso justifica o achado que os pacientes que receberam quimioterapia prévia tiveram pior SLD, inclusive na análise múltipla.

A relação entre hemotransfusão perioperatória e pior prognóstico no CCR primário está bem estabelecida na literatura. O mecanismo relacionado a

um aumento da recorrência do tumor não está completamente entendido. A hipótese é que a hemotransfusão possa induzir uma relativa imunossupressão no paciente, pela diminuição da atividade das células de defesa, da atividade fagocitária, aumento na atividade de células T supressoras, com inibição da interleucina 2 e outras moléculas ligadas ao sistema imune¹⁶³. Assim, células tumorais circulantes podem escapar do sistema imune e predispor à recorrência tumoral precoce.

O impacto prognóstico da hemotransfusão perioperatória após ressecção de MHCCR também tem sido estudado desde os anos 1980¹⁶⁴ e 1990^{165,166}. Entretanto, todos estes resultados foram significativos apenas em análise univariada, não demonstrando sua importância como fator prognóstico independente. Schiergens et al.¹⁶³ demonstraram, em análises univariada e multivariada, que a transfusão sanguínea perioperatória esteve relacionada a menor SLD. Em dois outros estudos recentes, Jiang et al.¹⁶⁷ e Margonis et al.¹⁶⁸ identificaram a perda sanguínea perioperatória como fator independente e mais importante do que a hemotransfusão em pacientes com MHCCR submetidos a hepatectomia. Em nosso estudo, a hemotransfusão perioperatória esteve associada a menor SG e SLD em análise univariada, entretanto não foi fator prognóstico independente. Dado o caráter retrospectivo do estudo, a perda sanguínea perioperatória não pode ser estimada. Estes achados reforçam a importância de medidas para diminuir a perda sanguínea durante a ressecção de um órgão muito vascularizado como o fígado¹⁶⁹.

O presente estudo possui limitações. A primeira é o seu caráter retrospectivo, que não permitiu a obtenção de todos os dados, como estadiamento T e N, quimioterapia prévia e níveis de CEA pré-operatórios. Também não obtivemos acesso às lâminas de todos os casos operados durante o período, impossibilitando casuística maior. Outra limitação é o longo período de inclusão (2004-2014), tornando a população heterogênea na forma de tratamento, em especial em relação aos esquemas quimioterápicos e às técnicas operatórias empregadas.

Apesar das limitações, pudemos demonstrar a importância prognóstica de potenciais vias de disseminação intra-hepáticas nas MHCCR. Também demonstramos, de modo inédito, a importância dos GPD como fator

prognóstico independente na SG e SLD e sua relação com a recidiva extra-hepática. O conhecimento aqui gerado abre perspectivas para outros trabalhos futuros. Entre eles, ressaltamos a importância de estudos no sentido de compreender as alterações moleculares e genóticas que levam a estes fenótipos histopatológicos; a avaliação de outros mecanismos fenotípicos que tenham correlação com a TEM, como expressão de beta-catenina e E-caderina; a comparação entre os fatores histológicos no CCR primário, na MHCCR e em metástases extra-hepáticas, como o pulmão; maior aprofundamento nos aspectos imunológicos na MHCCR; e melhor entendimento da relação entre a distância da margem livre e os mecanismos de disseminação na borda tumoral.

6 CONCLUSÕES

Em relação à avaliação anatomopatológica das MHCCR ressecadas com intenção curativa, pode-se concluir que:

- Os BT e os GPD estão presentes em 48,9% e 49,3% dos pacientes, respectivamente.
- Ambos são fatores prognósticos na SG e SLD e não estão associados a recidiva hepática, mas à extra-hepática. A presença de GPD grau 3 é fator prognóstico independente na SG e SLD.
- Há concordância substancial na avaliação dos BT pelo HE e pelo AE1/AE3, enquanto na avaliação dos GPD tal concordância é menor, mas ainda assim considerável. A avaliação dos BT e GPD pelo HE representa maior importância prognóstica.
- Os BT e os GPD estão associados entre si.
- A presença de BT está associada a tumores sincrônicos, tumores de até 5cm, ausência de fibrose peritumoral (pseudocápsula), borda infiltrativa, e presença de invasão venosa portal.
- A presença dos GPD está associada a ausência de infiltrado inflamatório peritumoral, ausência de fibrose peritumoral (pseudocápsula) e borda infiltrativa.

7 REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Disponível de: <http://globocan.iarc.fr>, acessado em 01/07/2018.
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018 [Internet]. Disponível de: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>, acessado em 01/07/2018.
3. Mundade R, Imperiale TF, Prabhu L, Loehrer PJ, Lu T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience* 2014;1:400-6.
4. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2013.
5. Pestana C, Reitemeier RJ, Moertel CG, Judd ES, Dockerty MB. The natural history of carcinoma of the colon and rectum. *Am J Surg* 1964;108:826-9.
6. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW. Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol* 2006;94:68-80.
7. Slessor AA, Simillis C, Goldin R, Brown G, Mudan S, Tekkis PP. A meta-analysis comparing simultaneous versus delayed resections in patients with synchronous colorectal liver metastases. *Surg Oncol* 2013;22:36-47.
8. Wagner JS, Adson MA, Van Heerden JA, Adson MH, Ilstrup DM. The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment. *Ann Surg* 1984;199:502-8.
9. Holm A, Bradley E, Aldrete JS. Hepatic resection of metastasis from colorectal carcinoma. Morbidity, mortality, and pattern of recurrence. *Ann Surg* 1989;209:428-34.
10. Wilson SM, Adson MA. Surgical treatment of hepatic metastases from colorectal cancers. *Arch Surg* 1976;111:330-4.

11. Nordlinger B, Quilichini MA, Parc R, Hannoun L, Delva E, Huguet C. Hepatic resection for colorectal liver metastases. Influence on survival of preoperative factors and surgery for recurrences in 80 patients. *Ann Surg* 1987;205:256-63.
12. D'Albuquerque LAC, Oliveira e Silva A, Saad WA. Treatment of hepatic metastases of colorectal cancer. *Arq Bras Cir Dig* 1997;12:29-33.
13. Kopetz S, Chang GJ, Overman MJ, et al. Improved survival in metastatic colorectal cancer is associated with adoption of hepatic resection and improved chemotherapy. *J Clin Oncol* 2009;27:3677-83.
14. Imamura H, Seyama Y, Kokudo N, et al. One thousand fifty-six hepatectomies without mortality in 8 years. *Arch Surg* 2003;138:1198-206; discussion 206.
15. House MG, Ito H, Gonen M, et al. Survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: trends in outcomes for 1,600 patients during two decades at a single institution. *J Am Coll Surg* 2010;210:744-52, 52-5.
16. Sharma R, Gibbs JF. Recent advances in the management of primary hepatic tumors refinement of surgical techniques and effect on outcome. *J Surg Oncol* 2010;101:745-54.
17. Vigano L, Russolillo N, Ferrero A, Langella S, Sperti E, Capussotti L. Evolution of long-term outcome of liver resection for colorectal metastases: analysis of actual 5-year survival rates over two decades. *Ann Surg Oncol* 2012;19:2035-44.
18. Jones RP, Stattner S, Sutton P, et al. Controversies in the oncosurgical management of liver limited stage IV colorectal cancer. *Surg Oncol* 2014;23:53-60.
19. Adam R, Delvart V, Pascal G, et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004;240:644-57; discussion 57-8.
20. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, et al. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer* 1996;77:1254-62.

21. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, et al. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *J Clin Oncol* 2007;25:4575-80.
22. Frankel TL, D'Angelica MI. Hepatic resection for colorectal metastases. *J Surg Oncol* 2014;109:2-7.
23. Andres A, Majno PE, Morel P, et al. Improved long-term outcome of surgery for advanced colorectal liver metastases: reasons and implications for management on the basis of a severity score. *Ann Surg Oncol* 2008;15:134-43.
24. Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF, et al. Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* 2002;235:759-66.
25. Arru M, Aldrighetti L, Castoldi R, et al. Analysis of prognostic factors influencing long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *World J Surg* 2008;32:93-103.
26. Zakaria S, Donohue JH, Que FG, et al. Hepatic resection for colorectal metastases: value for risk scoring systems? *Ann Surg* 2007;246:183-91.
27. Nordlinger B, Vauthey JN, Poston G, Benoist S, Rougier P, Van Cutsem E. The timing of chemotherapy and surgery for the treatment of colorectal liver metastases. *Clin Colorectal Cancer* 2010;9:212-8.
28. Figueras J, Torras J, Valls C, et al. Surgical resection of colorectal liver metastases in patients with expanded indications: a single-center experience with 501 patients. *Dis Colon Rectum* 2007;50:478-88.
29. Homayounfar K, Bleckmann A, Conradi LC, et al. Metastatic recurrence after complete resection of colorectal liver metastases: impact of surgery and chemotherapy on survival. *Int J Colorectal Dis* 2013;28:1009-17.
30. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012;106:1713-7.
31. (UICC) IUAC. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 7th Edition. New York: Wiley; 2009.
32. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol* 2012;25:1315-25.
33. (UICC) IUAC. *Prognostic Factors in Cancer*, 3rd Edition. New York: Wiley; 2006.

34. Yamamoto J, Shimada K, Kosuge T, Yamasaki S, Sakamoto M, Fukuda H. Factors influencing survival of patients undergoing hepatectomy for colorectal metastases. *Br J Surg* 1999;86:332-7.
35. Okano K, Yamamoto J, Kosuge T, et al. Fibrous pseudocapsule of metastatic liver tumors from colorectal carcinoma. Clinicopathologic study of 152 first resection cases. *Cancer* 2000;89:267-75.
36. Sasaki A, Aramaki M, Kawano K, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Prognostic significance of intrahepatic lymphatic invasion in patients with hepatic resection due to metastases from colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;95:105-11.
37. Korita PV, Wakai T, Shirai Y, et al. Intrahepatic lymphatic invasion independently predicts poor survival and recurrences after hepatectomy in patients with colorectal carcinoma liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2007;14:3472-80.
38. Knijn N, de Ridder JA, Punt CJ, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Histopathological evaluation of resected colorectal cancer liver metastases: what should be done? *Histopathology* 2013;63:149-56.
39. Viana EF, Herman P, Coelho FF, Taka TA, D'Albuquerque LA, Cecconello I. The role of hilar lymphadenectomy in patients subjected to hepatectomy due to colorectal metastasis. *Arq Gastroenterol* 2011;48:217-9.
40. Lupinacci RM, Herman P, Coelho FC, Viana EF, D'Albuquerque LA, Cecconello I. Diagnosis and impact of hilar lymph node micrometastases on the outcome of resected colorectal liver metastasis. *Hepatogastroenterology* 2013;60:333-6.
41. Lupinacci RM, Mello ES, Pinheiro RS, et al. Intrahepatic lymphatic invasion but not vascular invasion is a major prognostic factor after resection of colorectal cancer liver metastases. *World J Surg* 2014;38:2089-96.
42. Lupinacci RM, Paye F, Coelho FF, Kruger JA, Herman P. Lymphatic drainage of the liver and its implications in the management of colorectal cancer liver metastases. *Updates Surg* 2014;66:239-45.
43. Lupinacci RM, Mello ES, Coelho FF, et al. Prognostic implication of mucinous histology in resected colorectal cancer liver metastases. *Surgery* 2014;155:1062-8.

44. Pinheiro RS, Herman P, Lupinacci RM, et al. Tumor growth pattern as predictor of colorectal liver metastasis recurrence. *Am J Surg* 2014;207:493-8.
45. Fonseca GM, Herman P, Faraj SF, et al. Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol. *Histopathology* 2018;72:377-90.
46. Fonseca GM, de Mello ES, Faraj SF, et al. Prognostic significance of poorly differentiated clusters and tumor budding in colorectal liver metastases. *J Surg Oncol* 2018;117:1364-75.
47. de Ridder JA, Knijn N, Wiering B, de Wilt JH, Nagtegaal ID. Lymphatic Invasion is an Independent Adverse Prognostic Factor in Patients with Colorectal Liver Metastasis. *Ann Surg Oncol* 2015;22 Suppl 3:S638-45.
48. Hayashi M, Inoue Y, Komeda K, et al. Clinicopathological analysis of recurrence patterns and prognostic factors for survival after hepatectomy for colorectal liver metastasis. *BMC Surg* 2010;10:27.
49. Gomez D, Zaitoun AM, De Rosa A, et al. Critical review of the prognostic significance of pathological variables in patients undergoing resection for colorectal liver metastases. *HPB (Oxford)* 2014;16:836-44.
50. Park MS, Yi NJ, Son SY, et al. Histopathologic factors affecting tumor recurrence after hepatic resection in colorectal liver metastases. *Ann Surg Treat Res* 2014;87:14-21.
51. John SK, Robinson SM, Rehman S, et al. Prognostic factors and survival after resection of colorectal liver metastasis in the era of preoperative chemotherapy: an 11-year single-centre study. *Dig Surg* 2013;30:293-301.
52. Shirabe K, Takenaka K, Gion T, et al. Analysis of prognostic risk factors in hepatic resection for metastatic colorectal carcinoma with special reference to the surgical margin. *Br J Surg* 1997;84:1077-80.
53. Lai EC, Ng IO, Ng MM, et al. Long-term results of resection for large hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of clinicopathological features. *Hepatology* 1990;11:815-8.
54. Ambiru S, Miyazaki M, Isono T, et al. Hepatic resection for colorectal metastases: analysis of prognostic factors. *Dis Colon Rectum* 1999;42:632-9.

55. Morino T, Tanaka J, Tobe T. Clinico-pathological features of liver metastases from colorectal cancer in relation to prognosis. *Nihon Geka Hoka* 1991;60:154-64.
56. Wiggins MG, Shahtahmassebi G, Malcolm P, et al. Extended pathology reporting of resection specimens of colorectal liver metastases: the significance of a tumour pseudocapsule. *HPB (Oxford)* 2013;15:687-94.
57. Lunevicius R, Nakanishi H, Ito S, et al. Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:193-9.
58. Nagashima I, Oka T, Hamada C, Naruse K, Osada T, Muto T. Histopathological prognostic factors influencing long-term prognosis after surgical resection for hepatic metastases from colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 1999;94:739-43.
59. Ohlsson B, Stenram U, Tranberg KG. Resection of colorectal liver metastases: 25-year experience. *World J Surg* 1998;22:268-76; discussion 76-7.
60. Jass JR, Love SB, Northover JM. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987;1:1303-6.
61. Yamaguchi J, Komuta K, Matsuzaki S, Okudaira S, Fujioka H, Kanematsu T. Mode of infiltrative growth of colorectal liver metastases is a useful predictor of recurrence after hepatic resection. *World J Surg* 2002;26:1122-5.
62. Furukawa T, Watanabe S, Kodama T, Sato Y, Shimosato Y, Suemasu K. T-zone histiocytes in adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative prognosis. *Cancer* 1985;56:2651-6.
63. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *Eur J Cancer* 1992;28a:859-64.
64. Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer* 1992;29a:69-75.
65. Setälä LP, Kosma VM, Marin S, et al. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *Br J Cancer* 1996;74:766-72.

66. Svennevig JL, Lunde OC, Holter J, Bjorgsvik D. Lymphoid infiltration and prognosis in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1984;49:375-7.
67. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol* 1986;39:585-9.
68. Lang-Schwarz C, Melcher B, Haumaier F, et al. Budding and tumor infiltrating lymphocytes - combination of both parameters predicts survival in colorectal cancer and leads to new prognostic subgroups. *Hum Pathol* 2018.
69. Okano K, Maeba T, Moroguchi A, et al. Lymphocytic infiltration surrounding liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2003;82:28-33.
70. Brunner SM, Kesselring R, Rubner C, et al. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *Br J Surg* 2014;101:1681-91.
71. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* 2009;119:1417-9.
72. Yoshida GJ. Emerging role of epithelial-mesenchymal transition in hepatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:141.
73. Samarasinghe B. The Hallmarks of Cancer 6: Tissue Invasion and Metastasis [Internet].
74. Ueno H, Mochizuki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Hase K, Talbot IC. Histologic indices in biopsy specimens for estimating the probability of extended local spread in patients with rectal carcinoma. *Cancer* 2002;94:2882-91.
75. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 2017;30:1299-311.
76. De Smedt L, Palmans S, Andel D, et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer* 2017;116:58-65.
77. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:151-66.
78. Imai T. The growth of human carcinoma: a morphological analysis. 1954;45:30.

79. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989;63:539-43.
80. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, et al. Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. *J Thorac Oncol* 2010;5:1361-8.
81. Ohike N, Coban I, Kim GE, et al. Tumor budding as a strong prognostic indicator in invasive ampullary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1417-24.
82. O'Connor K, Li-Chang HH, Kalloger SE, et al. Tumor Budding Is an Independent Adverse Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2015;39:472-8.
83. Brown M, Sillah K, Griffiths EA, et al. Tumour budding and a low host inflammatory response are associated with a poor prognosis in oesophageal and gastro-oesophageal junction cancers. *Histopathology* 2010;56:893-9.
84. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1993;36:627-35.
85. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016;115:831-40.
86. Choi DH, Sohn DK, Chang HJ, Lim SB, Choi HS, Jeong SY. Indications for subsequent surgery after endoscopic resection of submucosally invasive colorectal carcinomas: a prospective cohort study. *Dis Colon Rectum* 2009;52:438-45.
87. Komori K, Hirai T, Kanemitsu Y, et al. Is "depth of submucosal invasion > or = 1,000 microm" an important predictive factor for lymph node metastases in early invasive colorectal cancer (pT1)? *Hepatogastroenterology* 2010;57:1123-7.
88. Tateishi Y, Nakanishi Y, Taniguchi H, Shimoda T, Umemura S. Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2010;23:1068-72.

89. Cappellesso R, Luchini C, Veronese N, et al. Tumor budding as a risk factor for nodal metastasis in pT1 colorectal cancers: a meta-analysis. *Hum Pathol* 2017;65:62-70.
90. Yim K, Won DD, Lee IK, Oh ST, Jung ES, Lee SH. Novel predictors for lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2017;23:5936-44.
91. Backes Y, Elias SG, Groen JN, et al. Histologic Factors Associated With Need for Surgery in Patients With Pedunculated T1 Colorectal Carcinomas. *Gastroenterology* 2018;154:1647-59.
92. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:134-41.
93. Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M. Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1400-6.
94. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, et al. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2008;10:41-7.
95. Shinto E, Jass JR, Tsuda H, et al. Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: tumor budding and cytoplasmic podia. *Dis Colon Rectum* 2006;49:1422-30.
96. Suzuki A, Togashi K, Nokubi M, et al. Evaluation of venous invasion by Elastica van Gieson stain and tumor budding predicts local and distant metastases in patients with T1 stage colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2009;33:1601-7.
97. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Ann Surg* 2004;240:832-9.
98. van Wyk HC, Park JH, Edwards J, Horgan PG, McMillan DC, Going JJ. The relationship between tumour budding, the tumour microenvironment and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Br J Cancer* 2016;115:156-63.
99. Ryan E, Khaw YL, Creavin B, et al. Tumor Budding and PDC Grade are Stage Independent Predictors of Clinical Outcome in Mismatch Repair Deficient Colorectal Cancer. *Am J Surg Pathol* 2018;42:60-8.

100. Park JH, van Wyk H, Roxburgh CSD, Horgan PG, Edwards J, McMillan DC. Tumour invasiveness, the local and systemic environment and the basis of staging systems in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2017;116:1444-50.
101. Turner RR, Li C, Compton CC. Newer pathologic assessment techniques for colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:6871s-6s.
102. Jass JR, O'Brien MJ, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *Virchows Arch* 2007;450:1-13.
103. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K. Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2005;52:1432-5.
104. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol* 2013;44:697-705.
105. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology* 2005;47:17-24.
106. Puppa G, Senore C, Sheahan K, et al. Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy. *Histopathology* 2012;61:562-75.
107. De Smedt L, Palmans S, Sagaert X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Arch* 2016;468:397-408.
108. Ohtsuki K, Koyama F, Tamura T, et al. Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2008;28:1831-6.
109. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2012;36:193-201.
110. Ueno H, Konishi T, Ishikawa Y, et al. Prognostic value of poorly differentiated clusters in the primary tumor in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis. *Surgery* 2015;157:899-908.

111. Reggiani Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Domati F, Palmiere C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known. *Diagn Pathol* 2016;11:31.
112. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *Int J Surg Pathol* 2011;19:751-60.
113. Kajiwara Y, Ueno H, Hashiguchi Y, et al. Expression of I1 cell adhesion molecule and morphologic features at the invasive front of colorectal cancer. *Am J Clin Pathol* 2011;136:138-44.
114. Kajiwara Y, Ueno H, Hashiguchi Y, et al. Heterogeneity of metalloproteinase expression in colorectal cancer - relation of molecular findings to basic morphology. *Anticancer Res* 2011;31:1567-75.
115. Shibutani M, Noda E, Maeda K, Nagahara H, Ohtani H, Hirakawa K. Low expression of claudin-1 and presence of poorly-differentiated tumor clusters correlate with poor prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2013;33:3301-6.
116. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Branca G, Di Gregorio C, Ponz de Leon M, Tuccari G. Colorectal carcinoma grading by quantifying poorly differentiated cell clusters is more reproducible and provides more robust prognostic information than conventional grading. *Virchows Arch* 2012;461:621-8.
117. Barresi V, Bonetti LR, Ieni A, Branca G, Baron L, Tuccari G. Histologic grading based on counting poorly differentiated clusters in preoperative biopsy predicts nodal involvement and pTNM stage in colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2014;45:268-75.
118. Barresi V, Branca G, Ieni A, et al. Poorly differentiated clusters (PDCs) as a novel histological predictor of nodal metastases in pT1 colorectal cancer. *Virchows Arch* 2014;464:655-62.
119. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Poorly Differentiated Clusters: Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2017;16:9-15.

120. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, et al. Site-specific tumor grading system in colorectal cancer: multicenter pathologic review of the value of quantifying poorly differentiated clusters. *Am J Surg Pathol* 2014;38:197-204.
121. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform* 2009;42:377-81.
122. Charnsangavej C, Clary B, Fong Y, Grothey A, Pawlik TM, Choti MA. Selection of patients for resection of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* 2006;13:1261-8.
123. Bismuth H, Houssin D, Castaing D. Major and minor segmentectomies "reglees" in liver surgery. *World J Surg* 1982;6:10-24.
124. Taylor M, Forster J, Langer B, Taylor BR, Greig PD, Mahut C. A study of prognostic factors for hepatic resection for colorectal metastases. *Am J Surg* 1997;173:467-71.
125. Yokoyama N, Shirai Y, Ajioka Y, Nagakura S, Suda T, Hatakeyama K. Immunohistochemically detected hepatic micrometastases predict a high risk of intrahepatic recurrence after resection of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2002;94:1642-7.
126. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg* 2004;240:205-13.
127. Viana EF, Herman P, Siqueira SC, et al. Lymphadenectomy in colorectal cancer liver metastases resection: incidence of hilar lymph nodes micrometastasis. *J Surg Oncol* 2009;100:534-7.
128. Herman P, Pinheiro RS, Mello ES, et al. Surgical margin size in hepatic resections for colorectal metastasis: impact on recurrence and survival. *Arq Bras Cir Dig* 2013;26:309-14.
129. Witte MH, Dellinger MT, McDonald DM, et al. Lymphangiogenesis and hemangiogenesis: potential targets for therapy. *J Surg Oncol* 2011;103:489-500.

130. Kim JW, Shin MK, Kim BC. Clinicopathologic impacts of poorly differentiated cluster-based grading system in colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci* 2015;30:16-23.
131. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Branca G, Tuccari G. Histologic prognostic markers in stage IIA colorectal cancer: a comparative study. *Scand J Gastroenterol* 2016;51:314-20.
132. Kinoshita O, Kishimoto M, Murayama Y, et al. Poorly differentiated clusters with larger extents have a greater impact on survival: a semi-quantitative pathological evaluation for 239 patients with non-mucinous pT2-3 colorectal carcinoma. *World J Surg Oncol* 2015;13:140.
133. Barresi V, Tuccari G. Colorectal carcinoma grading quantified by counting poorly differentiated clusters: is it feasible on endoscopic biopsies? *Am J Surg Pathol* 2013;37:943-5.
134. Barresi V, Bonetti LR, Bettelli S. KRAS, NRAS, BRAF mutations and high counts of poorly differentiated clusters of neoplastic cells in colorectal cancer: observational analysis of 175 cases. *Pathology* 2015;47:551-6.
135. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kolzer V, et al. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2013;26:295-301.
136. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999;230:309-18; discussion 18-21.
137. Wakai T, Shirai Y, Sakata J, et al. Appraisal of 1 cm hepatectomy margins for intrahepatic micrometastases in patients with colorectal carcinoma liver metastasis. *Ann Surg Oncol* 2008;15:2472-81.
138. Nuzzo G, Giuliani F, Ardito F, et al. Influence of surgical margin on type of recurrence after liver resection for colorectal metastases: a single-center experience. *Surgery* 2008;143:384-93.
139. Rajaganeshan R, Prasad R, Guillou PJ, et al. The influence of invasive growth pattern and microvessel density on prognosis in colorectal cancer and colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2007;96:1112-7.

140. Serrablo A, Paliogiannis P, Pulighe F, et al. Impact of novel histopathological factors on the outcomes of liver surgery for colorectal cancer metastases. *Eur J Surg Oncol* 2016;42:1268-77.
141. Are C, Gonen M, Zazzali K, et al. The impact of margins on outcome after hepatic resection for colorectal metastasis. *Ann Surg* 2007;246:295-300.
142. Kato T, Yasui K, Hirai T, et al. Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. *Dis Colon Rectum* 2003;46:S22-31.
143. Dhir M, Lyden ER, Wang A, Smith LM, Ullrich F, Are C. Influence of margins on overall survival after hepatic resection for colorectal metastasis: a meta-analysis. *Ann Surg* 2011;254:234-42.
144. Kok NF, Grunhagen DJ, Ayez N, Verhoef C. Influence of margins on overall survival after hepatic resection for colorectal metastasis: a meta-analysis. *Ann Surg* 2015;261:e15.
145. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005;241:715-22, discussion 22-4.
146. Sadot E, Groot Koerkamp B, Leal JN, et al. Resection margin and survival in 2368 patients undergoing hepatic resection for metastatic colorectal cancer: surgical technique or biologic surrogate? *Ann Surg* 2015;262:476-85; discussion 83-5.
147. Lee WS, Kim MJ, Yun SH, et al. Risk factor stratification after simultaneous liver and colorectal resection for synchronous colorectal metastasis. *Langenbecks Arch Surg* 2008;393:13-9.
148. Vigano L, Capussotti L, Majno P, et al. Liver resection in patients with eight or more colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2015;102:92-101.
149. Spolverato G, Ejaz A, Azad N, Pawlik TM. Surgery for colorectal liver metastases: The evolution of determining prognosis. *World J Gastrointest Oncol* 2013;5:207-21.
150. Iwatsuki S, Dvorchik I, Madariaga JR, et al. Hepatic resection for metastatic colorectal adenocarcinoma: a proposal of a prognostic scoring system. *J Am Coll Surg* 1999;189:291-9.

151. Martí J, Modolo MM, Fuster J, et al. Prognostic factors and time-related changes influence results of colorectal liver metastases surgical treatment: A single-center analysis. *World J Gastroenterol* 2009;15:2587-94.
152. Smith MD, McCall JL. Systematic review of tumour number and outcome after radical treatment of colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2009;96:1101-13.
153. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Gall FP. Indicators of prognosis after hepatic resection for colorectal secondaries. *Surgery* 1991;110:13-29.
154. Mann CD, Metcalfe MS, Leopardi LN, Maddern GJ. The clinical risk score: emerging as a reliable preoperative prognostic index in hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg* 2004;139:1168-72.
155. Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clin Epidemiol* 2012;4:283-301.
156. Abbas S, Lam V, Hollands M. Ten-year survival after liver resection for colorectal metastases: systematic review and meta-analysis. *ISRN Oncol* 2011;2011:763245.
157. Wang Y, Liu YF, Cheng Y, et al. Prognosis of colorectal cancer with liver metastasis: value of a prognostic index. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:1116-22.
158. Adam R, de Haas RJ, Wicherts DA, et al. Concomitant extrahepatic disease in patients with colorectal liver metastases: when is there a place for surgery? *Ann Surg* 2011;253:349-59.
159. Portier G, Elias D, Bouche O, et al. Multicenter randomized trial of adjuvant fluorouracil and folinic acid compared with surgery alone after resection of colorectal liver metastases: FFCD ACHBTH AURC 9002 trial. *J Clin Oncol* 2006;24:4976-82.
160. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2013;14:1208-15.
161. Langer B, Bleiberg H, Labianca R, et al. Fluorouracil (FU) plus l-leucovorin (l-LV) versus observation after potentially curative resection of liver

or lung metastases from colorectal cancer (CRC): results of the ENG (EORTC/NCIC CTG/GIVIO) randomized trial. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:abstract 592.

162. Araujo RL, Gonen M, Herman P. Chemotherapy for patients with colorectal liver metastases who underwent curative resection improves long-term outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2015;22:3070-8.

163. Schiergens TS, Rentsch M, Kasperek MS, Frenes K, Jauch KW, Thasler WE. Impact of perioperative allogeneic red blood cell transfusion on recurrence and overall survival after resection of colorectal liver metastases. *Dis Colon Rectum* 2015;58:74-82.

164. Stephenson KR, Steinberg SM, Hughes KS, Vetto JT, Sugarbaker PH, Chang AE. Perioperative blood transfusions are associated with decreased time to recurrence and decreased survival after resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 1988;208:679-87.

165. Younes RN, Rogatko A, Brennan MF. The influence of intraoperative hypotension and perioperative blood transfusion on disease-free survival in patients with complete resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 1991;214:107-13.

166. Rosen CB, Nagorney DM, Taswell HF, et al. Perioperative blood transfusion and determinants of survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1992;216:493-504; discussion -5.

167. Jiang W, Fang YJ, Wu XJ, et al. Intraoperative blood loss independently predicts survival and recurrence after resection of colorectal cancer liver metastasis. *PLoS One* 2013;8:e76125.

168. Margonis GA, Kim Y, Samaha M, et al. Blood loss and outcomes after resection of colorectal liver metastases. *J Surg Res* 2016;202:473-80.

169. Kooby DA, Stockman J, Ben-Porat L, et al. Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2003;237:860-9; discussion 9-70.

Apêndices

Seguem os artigos científicos derivados desta tese e publicados em revistas indexadas internacionais:

- Fonseca GM, Herman P, Faraj SF, et al. Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol. *Histopathology* 2018;72:377-90.
- Fonseca GM, de Mello ES, Faraj SF, et al. Prognostic significance of poorly differentiated clusters and tumor budding in colorectal liver metastases. *J Surg Oncol.* 2018;117:1364-75.

REVIEW

Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol

Gilton M Fonseca,¹ Paulo Herman,¹ Sheila F Faraj,² Jaime A P Kruger,¹ Fabricio F Coelho,¹ Vagner B Jeismann,¹ Ivan Cecconello,¹ Venancio A F Alves,² Timothy M Pawlik³ & Evandro S de Mello²

¹Digestive Surgery Division, Department of Gastroenterology, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil, ²Department of Pathology, São Paulo State Cancer Institute, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil, and ³Department of Surgery, The Ohio State University, Wexner Medical Center, Columbus, OH, USA

Fonseca G M, Herman P, Faraj S F, Kruger J A P, Coelho F F, Jeismann V B, Cecconello I, Alves V A F, Pawlik T M & de Mello E S

(2018) *Histopathology* 72, 377–390. <https://doi.org/10.1111/his.13378>

Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol

Colorectal cancer is a leading cause of death worldwide. The liver is the most common site of distant metastases, and surgery is the only potentially curative treatment, although the recurrence rate following surgery is high. In order to define prognosis after surgery, many histopathological features have been identified in the primary tumour. In turn, pathologists routinely report specific findings to guide oncologists on the decision to recommend adjuvant therapy. In general, the pathological report of resected colorectal liver metastases is limited to confirmation of the malignancy and details regarding the margin status. Most pathological reports of a liver resection for

colorectal liver metastasis lack information on other important features that have been reported to be independent prognostic factors. We herein review the evidence to support a more detailed pathological report of the resected liver specimen, with attention to: the number and size of liver metastases; margin size; the presence of lymphatic, vascular, perineural and biliary invasion; mucinous pattern; tumour growth pattern; the presence of a tumour pseudocapsule; and the pathological response to neoadjuvant chemotherapy. In addition, we propose a new protocol for the evaluation of colorectal liver metastasis resection specimens.

Keywords: colorectal cancer, liver metastases, liver resection, pathology, prognosis

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed cancer in males and the second in females, with an annual overall estimated incidence of

1.4 million new cases and 693 900 deaths worldwide.¹ The liver is the most common site of distant metastases, and ~50% of patients with CRC present with liver metastases at diagnosis or during follow-up.^{2,3} Surgery is the only potentially curative treatment for colorectal liver metastases (CRLMs), with 5-year survival ranging from 46% to 58% in specialised centres.^{4–7}

In recent years, there has been an increase in the survival rate of patients with CRLMs, because of better chemotherapy regimens and improvements in

Address for correspondence: G M Fonseca, Digestive Surgery Division, Department of Gastroenterology, University of São Paulo Medical School, Avenida Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Instituto Central, 9 Andar, Sala 9074, 05403-900 Cerqueira Cesar, São Paulo, Brazil. e-mail: medgilton@yahoo.com.br

Prognostic significance of poorly differentiated clusters and tumor budding in colorectal liver metastases

Gilton M. Fonseca MD¹ | Evandro S. de Mello MD, PhD² | Sheila F. Faraj MD² |
Jaime A. P. Kruger MD¹ | Fabricio F. Coelho MD, PhD¹ |
Vagner B. Jeismann MD¹ | Renato M. Lupinacci MD, PhD³ |
Ivan Cecconello MD, PhD¹ | Venancio A. F. Alves MD, PhD² |
Timothy M. Pawlik MD, MPH, PhD⁴ | Paulo Herman MD, PhD¹

¹ Digestive Surgery Division, Liver Surgery Unit, Department of Gastroenterology, University of Sao Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

² Department of Pathology, University of Sao Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

³ Service de Chirurgie Digestive, Viscérale et Endocrinienne, Groupe Hospitalier Diaconesses, Croix Saint Simon, São Paulo, Brazil

⁴ The Ohio State University, Wexner Medical Center, Columbus, Ohio

Correspondence

Gilton M. Fonseca, Digestive Surgery Division, Liver Surgery Unit, Department of Gastroenterology, University of Sao Paulo Medical School, Avenida Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Instituto Central, 9º Andar, Sala 9074, CEP: 05403-900, Cerqueira Cesar-São Paulo, São Paulo, Brazil.
Email: medgilton@yahoo.com.br

Funding information

São Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant number: #2015/06551-4

Background: Histomorphological features have been described as prognostic factors after resection of colorectal liver metastases (CLM). The objectives of this study were to assess the prognostic significance of tumor budding (TB) and poorly differentiated clusters (PDC) among CLM, and their association with other prognostic factors.

Methods: We evaluated 229 patients who underwent a first resection of CLM. Slides stained by HE were assessed for TB, PDC, tumor border pattern, peritumoral pseudocapsule, peritumoral, and intratumoral inflammatory infiltrate. Lymphatic and portal invasion were evaluated through D2-40 and CD34 antibody.

Results: Factors independently associated with poor overall survival were nodules > 4 ($P = 0.002$), presence of PDC G3 ($P = 0.007$), portal invasion ($P = 0.005$), and absence of tumor pseudocapsule ($P = 0.006$). Factors independently associated with disease-free survival included number of nodules > 4 ($P < 0.001$), presence of PDC G3 ($P = 0.005$), infiltrative border ($P = 0.031$), portal invasion ($P = 0.006$), and absent/mild peritumoral inflammatory infiltrate ($P = 0.002$). PDC and TB were also associated with histological factors, as portal invasion (TB), peritumoral inflammatory infiltration (PDC), infiltrative border, and absence of tumor pseudocapsule (TB and PDC).

Conclusions: This is the first study demonstrating PDC as a prognostic factor in CLM. TB was also a prognostic factor, but it was not an independent predictor of survival.

KEYWORDS

colorectal liver metastases, liver resection, poorly differentiated cluster, prognosis, tumor budding

1 | INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide with an incidence that ranks second in men and third in

women.¹ Despite ongoing refinements in the TNM staging system to define prognosis and guide treatment, outcomes of CRC patients within each tumor stage still often vary considerably. As such, there is a need for novel morphological and molecular