

Roger Beltrati Coser

**Marcadores inflamatórios do sangue periférico e resposta à
terapia neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto**

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. Carlos Frederico Sparapan
Marques

São Paulo

2023

Roger Beltrati Coser

**Marcadores inflamatórios do sangue periférico e resposta à
terapia neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto**

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. Carlos Frederico Sparapan
Marques

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coser, Roger Beltrati

Marcadores inflamatórios do sangue periférico e resposta à terapia neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto / Roger Beltrati Coser. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Carlos Frederico Sparapan Marques.

Descritores: 1.Neoplasias retais 2.Inflamação
3.Terapia neoadjuvante 4.Biomarcadores tumorais
5.Neutrófilos 6.Linfócitos 7.Plaquetas 8.Monócitos

USP/FM/DBD-096/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha amada esposa Danielle, companheira inabalável de todos os momentos.

Às minhas amadas filhas Helena e Mariana, luzes de minha existência.

Aos meus amados pais Silvia e José, pelo amor e apoio incondicionais, permitindo que eu chegasse até aqui.

Aos meus amados irmãos Rodrigo e Renan, sempre presentes.

Aos meus amados avós Alice e Waldemar (*in memoriam*) e tios Marco Antônio (*in memoriam*) e Paulo, exemplos fundamentais para minha formação pessoal.

Agradecimentos

Ao Professor Carlos Frederico Sparapan Marques, pelo companheirismo e amizade de longa data, pela orientação, incentivo e colaboração, fundamentais em todas as etapas da realização deste projeto.

Ao Professor Sergio Carlos Nahas, pelo incentivo, apoio e orientação para a realização deste projeto.

Ao Professor Claudio José Caldas Bresciani, pela amizade, apoio e exemplo de excelência e dedicação à Medicina; pela oportunidade de convivência e aprendizado constante em todas as etapas de minha formação.

Ao Dr. Afonso Henrique da Silva e Sousa Júnior, pela amizade e convivência de longa data, pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram para o meu desenvolvimento científico.

À Professora Angelita Habr-Gama e ao Professor Joaquim José Gama-Rodrigues, pelo aprendizado e estímulo ao meu desenvolvimento na área cirúrgica desde os primeiros anos da minha formação médica.

Ao Professor Caio Sergio Rizkallah Nahas e ao Dr. Guilherme C. C. Cotti, pelo auxílio na obtenção dos dados deste projeto; aos Professores Fábio Guilherme C. M. de Campos, Rodrigo Âmbar Pinto, e ao Dr. Evandro Sobroza de Mello pela valiosa contribuição e sugestões na elaboração deste projeto.

Aos Professores José Jukemura, Ulysses Ribeiro Júnior e Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, por todo o suporte oferecido durante o curso de pós-graduação.

Ao Dr. Omar Sayed Taddeo Ghani, pelo apoio incansável na realização deste projeto e à Dra. Debora Yumi Yoshimura Orlandin Alves.

À Dra. Rafaela de Brito Bezerra e ao Serviço de Patologia do ICESP-HCFMUSP, pela preciosa contribuição na revisão de dados patológicos deste projeto.

Ao Dr. Alex Jones Flores Cassenote, Alexandre Guerra dos Santos e Cristiane de Jesus Almeida, pela valiosa contribuição na análise estatística deste projeto.

À Vilma Libério, pela ajuda e suporte constantes na secretaria de pós-graduação.

Ao amigo Dr. Arceu Scanavini Neto pelo companheirismo e convivência de longa data.

Ao Dr. José Américo Bacchi Hora, Prof. Carlos Walter Sobrado Jr., Dr. Antonio Rocco Imperiale, Dra. Mariane Gouvêa Monteiro de Camargo e aos demais amigos das Disciplinas de Cirurgia do Aparelho Digestivo e Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Normatização adotada

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 abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
1.1	Câncer de reto.....	2
1.2	Inflamação	10
1.3	Inflamação e câncer	11
1.3.1	O papel dos neutrófilos.....	14
1.3.2	O papel dos linfócitos	17
1.3.3	O papel dos monócitos	20
1.3.4	O papel das plaquetas	21
1.4	Elementos circulantes no sangue periférico como marcadores de resposta inflamatória sistêmica e sua relação com câncer.....	23
1.4.1	A razão neutrófilo-linfócito (RNL)	24
1.4.2	A razão plaqueta-linfócito (RPL)	25
1.4.3	A razão linfócito-monócito (RLM)	26
2	Objetivo	28
3	Casuística e Métodos	30
3.1	Desenho do estudo.....	31
3.2	População estudada	31
3.2.1	Critérios de inclusão	32
3.2.2	Critérios de exclusão	32
3.3	Aprovação na Comissão de Ética.....	33
3.4	Termo de consentimento	34
3.5	Coleta de dados	34
3.5.1	Variáveis clínicas e laboratoriais.....	34
3.5.2	Variáveis patológicas.....	35
3.5.3	Classificação dos graus de resposta à terapia neoadjuvante (TRG)	37
3.5.4	Análise laboratorial dos hemogramas utilizados no estudo.....	38
3.5.5	Cálculo de RNL, RPL e RLM	39
3.5.6	Análise estatística	40

4	Resultados	42
4.1	Descrição geral da amostra – variáveis clínicas e laboratoriais	43
4.2	Descrição geral da amostra – variáveis anatomopatológicas	47
4.3	Fatores associados aos graus de resposta à nQRT (TRG).....	52
4.4	Fatores associados à resposta completa à nQRT (TRG 0 vs 1-2-3).....	56
4.5	Fatores associados à estratificação entre “resposta boa” (TRG 0-1) e “resposta ruim” (TRG 2-3).....	59
4.6	Análise do potencial preditor de resposta à nQRT dos marcadores RNL, RPL e RLM	60
4.7	Modelo ajustado para avaliação de RNL , RPL e RLM na predição de resposta patológica completa.....	63
5	Discussão	65
5.1	Limitações do estudo.....	77
6	Conclusão.....	78
7	Anexos	80
8	Referências.....	92

Lista de abreviaturas e siglas

AINH	-	Anti-inflamatório não hormonal
AJCC	-	<i>American Joint Comitee on Cancer</i>
ARG1	-	Arginase
AUC	-	<i>Area Under the Curve</i> - Área sob a curva
Bax	-	<i>Bcl-2 associated X protein</i> - Proteína X associada ao gene Bcl-2
Bcl-2	-	Proteína Bcl-2
cCR	-	<i>Clinical Complete Response</i> - Resposta clínica completa
CEA	-	<i>Carcinoembryonic Antigen</i> - Antígeno Carcinoembrionário
cGy	-	Centigray
CHCM	-	Concentração de hemoglobina corpuscular média
cm	-	Centímetros
CXCL	-	Ligante de quimiocina
DNA	-	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
DP	-	Desvio padrão
EGFR	-	<i>Epidermal growth factor receptor</i> - Receptor do fator de crescimento epidérmico
fl	-	fentolitro
G-CSF	-	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> - Fator estimulador de colônias de granulócitos.
g/dl	-	Grama por decilitro
GM-CSF	-	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GP	-	Glicoproteína
Hb	-	Hemoglobina
HE	-	Coloração de hematoxilina-eosina
Ht	-	Hematócrito
IBP	-	Inibidor de bomba de prótons
IC	-	Intervalo de confiança
ICESP-HCFMUSP	-	Instituto do Câncer do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IFN	- Interferon
IgE	- Imunoglobulina E
IL	- Interleucina
iNOS	- <i>Inducible nitric oxide synthase</i> – Óxido nítrico sintase induzível
KRAS	- <i>Kirsten rat sarcoma virus</i> - Vírus do sarcoma murino de Kirsten
M-CSF	- <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> - Fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC	- <i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo de histocompatibilidade principal
mm ³	- Milímetro cúbico
MMP-9	- <i>Matrix metalloproteinase 9</i> – Metaloproteinase da matriz 9
MT	- Microambiente tumoral
N +	- Acometimento linfonodal por neoplasia
NFκB	- <i>Nuclear factor kappa B</i> - Fator nuclear kappa B
ng/ml	- Nanograma por mililitro
NK	- <i>Natural killer</i> – Exterminadora natural
nQRT	- Químio e radioterapia neoadjuvante
P25	- Percentil 25
p53	- Proteína 53
P75	- Percentil 75
pCR	- <i>Pathological Complete Response</i> - Resposta patológica completa
QRT	- Químio e radioterapia
RDW	- <i>Red blood cell distribution width</i> - Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos
RLM	- Razão linfócito-monócito
RNL	- Razão neutrófilo-linfócito
RNM	- Ressonância nuclear magnética
ROC	- <i>Receiver operating characteristic curve</i> – Curva característica de operação do receptor
RPL	- Razão plaqueta-linfócito

RR	-	Risco relativo
SE	-	<i>Standard error</i> – Erro padrão
SIDA	-	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Tfh	-	<i>T follicular helper cells</i> – Linfócitos T auxiliares foliculares
TGF- β	-	<i>Transforming growth factor β</i> - Fator de transformação do crescimento β
Th	-	<i>T helper</i> - Linfócitos T auxiliares
TNF	-	<i>Tumor necrosis factor</i> - Fator de necrose tumoral
TNM	-	Tumor, Linfonodos, Metástases
Treg	-	Linfócitos T reguladores
TRG	-	<i>Tumor response grade</i> - Grau de resposta tumoral
UICC	-	<i>Union for International Cancer Control</i> – União Internacional Contra o Câncer
VCM	-	Volume corpuscular médio
VEGF	-	<i>Vascular endothelial growth factor</i> - Fator de crescimento vascular endotelial

Lista de Figuras

- Figura 1** - Detalhe de foto de produto de retossigmoidectomia, reto aberto. Presença de adenocarcinoma ulcerado e infiltrativo (seta azul) ocupando grande parte da circunferência do ógão 3
- Figura 2** - Fluxograma apresentando indivíduos incluídos, motivos de exclusão e amostra final do estudo..... 43
- Figura 3** - (HE 40x) Resposta tumoral completa (TRG 0) evidenciando-se fibrose (seta branca), inflamação (seta azul) e calcificação distrófica (seta preta). 49
- Figura 4** - (HE 40x) Resposta tumoral completa (TRG 0) evidenciando-se lagos de mucina acelulares superficiais (**a**) e lagos de mucina acelulares nas camadas mais profundas (**b**) - setas pretas. 50
- Figura 5** - (HE 40x) Resposta tumoral quase completa (TRG 1) evidenciando-se extensos lagos de mucina com pequenos grupos de células neoplásicas residuais (setas pretas). 50
- Figura 6** - (HE 40x) Resposta tumoral parcial (TRG 2), evidenciando-se lesão residual (seta preta) com alguma evidência de regressão tumoral (lagos de mucina – seta branca)..... 51
- Figura 7** - (HE 40x) Ausência de resposta (TRG 3), evidenciando-se extensa neoplasia residual - seta branca (**a**), e neoplasia residual (seta branca), com intenso infiltrado inflamatório (seta preta) (**b**). 51

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Características clínicas da população estudada (variáveis quantitativas); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	44
Tabela 1.2 - Características clínicas da população estudada (variáveis qualitativas); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	45
Tabela 2 - Características laboratoriais da população estudada*; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	46
Tabela 3 - Características anatomopatológicas da população estudada*; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	47
Tabela 4.1 - Características clínicas qualitativas estratificadas de acordo com a classificação TRG, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016 ...	53
Tabela 4.2 - Características quantitativas estratificadas de acordo com a classificação TRG, incluindo média (\pm desvio padrão) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	55
Tabela 5.1 - Marcadores inflamatórios no sangue periférico estratificados de acordo com resposta completa à nQRT (TRG 0) e incompleta (TRG 1-2-3), incluindo média (\pm desvio padrão) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	56
Tabela 5.2 - Demais características quantitativas estratificadas de acordo com resposta completa à nQRT (TRG 0) e incompleta (TRG 1-2-3), incluindo média (\pm desvio padrão) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	57
Tabela 5.3 - Características clínicas qualitativas estratificadas de acordo com resposta completa à nQRT (TRG 0) e incompleta (TRG 1-2-3), incluindo frequência absoluta, relativa, intervalo de confiança de 95%(IC95%) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	58
Tabela 6 - Área sob a curva para RNL, RPL e RLM; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016	60
Tabela 7 - Estimativas de risco relativo bruto para resposta incompleta à nQRT (TRG 1-2-3) de RNL, RPL e RLM, incluindo intervalo de confiança de 95% e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016.....	62
Tabela 8 - Estimativas de risco ajustado para resposta completa à nQRT, incluindo risco relativo, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo*; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016 .	63
Tabela 9 - Resultados conflitantes de diversos estudos sobre a relação entre RNL, RPL, RLM e a resposta patológica à nQRT	68

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição do escore de TRG entre os indivíduos avaliados	48
Gráfico 2 - Área sob a curva para RNL , RPL e RLM.	61
Gráfico 3 - Área sob a curva do modelo múltiplo apresentado na Tabela 8	64

RESUMO

Coser, RB. *Marcadores inflamatórios do sangue periférico e resposta à terapia neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2023.

INTRODUÇÃO: O câncer de reto apresenta elevada incidência no Brasil. Seu tratamento é complexo, multimodal e associado à elevada morbidade, com prejuízo para a qualidade de vida dos pacientes. Sabe-se que os pacientes submetidos à quimio e radioterapia neoadjuvante (nQRT) apresentam diferentes graus de resposta tumoral, variando desde a ausência de resposta até a resposta completa (RC), com desaparecimento do tumor. Há grande interesse no estudo de ferramentas que possam identificar esses pacientes (respondedores e não respondedores) antes de iniciar o tratamento. Dentre essas ferramentas, encontram-se os marcadores inflamatórios do sangue periférico: a razão neutrófilo-linfócito (RNL), a razão plaqueta-linfócito (RPL) e a razão linfócito-monócito (RLM), baseados na íntima relação entre inflamação e câncer. **OBJETIVO:** Estudar, dentre os pacientes com neoplasia de reto submetidos à nQRT, a relação entre os marcadores de resposta inflamatória sistêmica (RNL, RPL e RLM) e os graus de resposta ao tratamento neoadjuvante, de acordo com a classificação TRG. **CASUÍSTICA E MÉTODOS:** Foram avaliados, de forma retrospectiva, 396 pacientes uni-institucionais com neoplasia de reto submetidos à nQRT. A avaliação envolveu dados clínicos, laboratoriais e patológicos. Calculou-se RNL, RPL e RLM com base em dados de hemogramas pré-nQRT dos pacientes. Os pacientes foram estratificados por grau de resposta tumoral (TRG) à nQRT, com base no protocolo do Colégio Americano de Patologistas. **RESULTADOS:** As variáveis RNL, RPL, CEA, número de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, além de tamanho do tumor e número de linfonodos comprometidos, apresentaram valores significativamente mais elevados entre os pacientes com resposta incompleta à nQRT (TRG 1-2-3). Também se observou maior percentual de pacientes do sexo masculino entre os pacientes com resposta incompleta à nQRT. Entre os pacientes com resposta completa (TRG 0), apresentaram valores significativamente mais elevados as variáveis: número de comorbidades, hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht) e RLM, além de maior percentual de pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva e antiagregante plaquetário/anticoagulante neste grupo de pacientes. As variáveis RNL, RPL e RLM apresentaram potencial preditivo de resposta à nQRT ($p < 0,001$). RNL $> 2,08$ mostrou risco relativo (RR) de 2,30 (IC95%: 1,60-3,31) para estimar resposta incompleta (TRG 1-2-3); RPL $> 129,36$ mostrou RR de 1,79 (IC95%: 1,25-2,05) e a RLM $> 2,67$ mostrou RR de 0,42 (IC95%: 0,26-0,66). No modelo linear generalizado múltiplo, RNL $> 2,08$ associou-se, de forma independente, à ausência de RC (RR:1,19; IC95%: 1,07 - 1,28), $p=0,001$, com área sob a curva (AUC) de 0,659 (IC95%: 0,599- 0,718). **CONCLUSÃO:** RNL, RPL, RLM são preditores de resposta à nQRT em pacientes com câncer de reto. RNL maior que 2,08 é fator preditivo independente para resposta patológica incompleta à nQRT. Estes achados agregam uma ferramenta de baixíssimo custo e amplamente disponível ao arsenal de manejo do câncer de reto, com foco na individualização do tratamento para obtenção do melhor resultado possível para cada paciente.

Descritores: Neoplasias retais; Inflamação; Terapia neoadjuvante; Biomarcadores tumorais; Neutrófilos; Linfócitos; Plaquetas; Monócitos.

ABSTRACT

Coser, RB. *Peripheral blood inflammatory markers and response to neoadjuvant therapy in rectal cancer patients* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

INTRODUCTION: Rectal cancer has a high incidence in Brazil. Its treatment is complex, multimodal, associated with high morbidity and impact in patient’s quality of life. It is known that patients undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy (nCRT) shows different degrees of tumor response, ranging from no response to complete response (CR). There is a search for tools that can correctly identify these patients (responders and non-responders) before starting treatment. Among these tools, the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) and the lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) constitutes peripheral blood systemic inflammatory markers, based on cancer-inflammation interactions. **OBJECTIVE:** To study, in selected rectal cancer patients, the association between systemic inflammatory markers (NLR, PLR and LMR) and response degrees to nCRT, according to the tumor response grade (TRG) classification. **PATIENTS AND METHODS:** Single institution retrospective study, evaluating 396 patients with rectal cancer submitted to nCRT. Clinical, laboratorial, and pathological data were obtained from patient’s electronic record. NLR, PLR and LMR were calculated based on pre-nCRT blood count data from each patient. Patients were stratified by TRG, according to the College of American Pathologists protocol. **RESULTS:** TRG 1-2-3 patients (incomplete response to nCRT) had statistically significant higher values of NLR, PLR, CEA, white blood cell count, neutrophil count, eosinophil count and monocyte count, as well as significantly higher tumor size, number of positive lymph nodes (LN) and percentage of male patients. Complete responders (TRG 0) had statistically significant higher values of comorbidity number, hemoglobin level (Hb), hematocrit level (Ht) and LMR, as well as significantly higher percentage of patients using anti-hypertensive drugs and platelet antiagregant/anticoagulant drugs. NLR, PLR and LMR are potential predictors of nCRT complete response ($p < 0.001$). To estimate TRG 1-2-3 (incomplete response): $NLR > 2.08$ – (RR: 2.30; 95%CI: 1.60-3.31); $PLR > 129.36$ – (RR: 1.79; 95%CI: 1.25-2.05) and $LMR > 2.67$ – (RR: 0.42; 95%CI: 0.26-0.66). In a multiple generalized linear model, $NLR > 2.08$ was independently associated with incomplete response to nCRT (RR=1.19; 95%CI: 1.07 - 1.28), $p=0.001$; AUC: 0.659 (95%CI: 0.599 - 0.718). **CONCLUSION:** NLR, PLR and LMR are nCRT response predictors in patients with rectal cancer. $NLR > 2.08$ is an independent predictive factor for pathological incomplete response to nCRT. These findings add a very low-cost and widely available tool to the arsenal of rectal cancer management, focusing on treatment individualization to obtain the best possible outcome for each patient.

Keywords: Rectal neoplasms; Inflammation; Neoadjuvant therapy; Biomarkers, tumor; Neutrophils; Lymphocytes; Blood platelets; Monocytes.

1 Introdução

1.1 Câncer de reto

O câncer colorretal é o segundo tipo de câncer mais frequente no Brasil, com estimativa de 45.630 casos no ano de 2022. Trata-se da terceira neoplasia com maior mortalidade no país, tendo sido responsável por 20.245 mortes no ano de 2020, sendo 9.889 em homens e 10.356 mulheres⁽¹⁾. Assim como no Brasil, a incidência em outros países também é elevada; nos Estados Unidos da América o câncer colorretal foi estimado como a terceira neoplasia mais comum (147.950 novos casos), e como a terceira causa de morte por neoplasia em ambos os sexos (53.200 casos). Considerando-se apenas o câncer de reto, este respondeu por cerca de um terço da estimativa de novos casos naquele país em 2020⁽²⁾.

Grandes avanços foram obtidos na prevenção, no diagnóstico e no tratamento precoce desta doença, ressaltando-se a importância da disseminação do exame de colonoscopia, principalmente a partir do ano 2000, com baixas taxas de morbimortalidade^(3, 4). A realização de polipectomias colabora para a queda na incidência de câncer colorretal⁽⁵⁾.

O câncer de reto (demonstrado na Figura 1) difere em muitas características do câncer de cólon, uma vez que o reto tem origem embriológica específica e apresenta anatomia particular, com vias de drenagem venosa e linfática específicas. A localização pélvica, a relação de proximidade com outros órgãos, a inervação visceral e somática e a proximidade com o aparelho esfinteriano, que muitas vezes pode ser envolvido pela doença, ressaltam ainda mais estas diferenças.

O tratamento do câncer de reto é, portanto, mais complexo que o do câncer de cólon, envolvendo maior morbidade, por vezes com cirurgias mutilantes, necessidade de

colostomia definitiva e risco de incontinência; fatores estes associados à perda significativa de qualidade de vida dos pacientes.

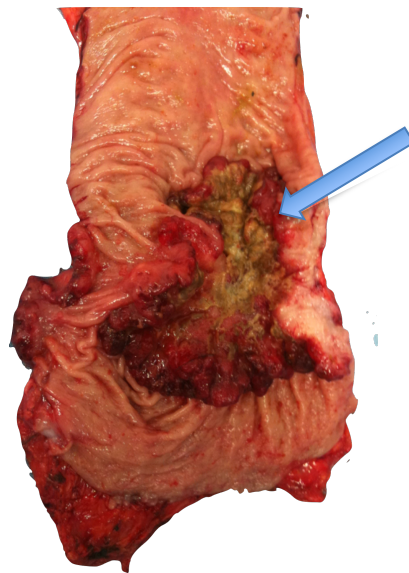


Figura 1 - Detalhe de foto de produto de retossigmoidectomia, reto aberto. Presença de adenocarcinoma ulcerado e infiltrativo (seta azul) ocupando grande parte da circunferência do órgão
Fonte: Acervo pessoal.

Historicamente, o câncer de reto era tratado através de ressecção perineal não regrada associada a sigmoidostomia, com elevadíssimas taxas de recidiva local e morbimortalidade⁽⁶⁾.

Esta realidade somente começou a ser alterada após a contribuição de Ernest Miles⁽⁷⁾, que publicou na revista Lancet, em 1908, seu trabalho sobre amputação abdominoperineal do reto, entendendo que o tratamento do tumor envolve sua ressecção em bloco com os linfonodos regionais presentes.

A partir de então, com a colaboração de observações anatomopatológicas⁽⁸⁾, surgiram novas evidências que deram base a esta mudança de paradigma no tratamento

do câncer do reto, passando-se a realizar a cirurgia não somente do tumor, mas também do mesorreto contendo os linfonodos regionais.

O melhor entendimento das metástases linfonodais como um dos principais fatores responsáveis pela recidiva tumoral levou à taxas de recidivas locais progressivamente menores com consequente melhora da sobrevida global⁽⁹⁾.

Outro importante marco na evolução do tratamento cirúrgico do câncer de reto foi a introdução, a partir de 1939, das operações de preservação esfinteriana, também conhecidas como ressecções anteriores^(10, 11), evitando que os pacientes fossem submetidos a colostomias definitivas.

Heald⁽¹²⁾ aprimorou a cirurgia de ressecção anterior com padronização da excisão total do mesorreto, descrevendo, em 1986, a dissecação sob visão direta, sem violação do mesorreto, obtendo redução da taxa de recidiva local de 30 a 40% para 3,7%.

Paralelamente ao tratamento cirúrgico, outras modalidades de tratamento do câncer de reto eram desenvolvidas. A aplicação de radioterapia pré-operatória (neoadjuvante) foi primeiramente descrita no início da década de 1920⁽⁶⁾, sendo observada redução do volume tumoral ao se aplicar elemento radioativo diretamente sobre o tumor.

Com a combinação do tratamento cirúrgico à radioterapia e à quimioterapia, surgiu o conceito de tratamento multimodal do câncer de reto.

A escolha da melhor estratégia de tratamento era controversa, seja com radioterapia ou quimioterapia exclusivas ou combinação de ambas.

Na tentativa de responder esta dúvida, o “*Gastrointestinal study group*”⁽¹³⁾ comparou pacientes tratados sem terapia adjuvante pós-operatória, pacientes tratados com radioterapia exclusiva pós-operatória (4000 ou 4800 cCy), pacientes tratados com quimioterapia exclusiva pós-operatória e pacientes tratados através de combinação de

químio e radioterapia pós-operatória, observando menor recidiva local em seguimento de 5 anos no grupo que recebeu combinação de químio e radioterapia pós-operatória: 33% *versus* 55% no grupo controle, sem diferenças quanto a sobrevida global.

Outros estudos avaliando a utilização de radioterapia pré-operatória mostraram significativa redução das taxas de recidiva local^(14, 15).

Nessa mesma linha, Krook et al.⁽¹⁶⁾ também publicaram importantes dados comparando radioterapia exclusiva pós-operatória (4500 ou 5040 cGy) com radioterapia associada a quimioterapia (fluorouracil) pós-operatória em pacientes portadores de câncer de reto localmente avançado ou com acometimento linfonodal, demonstrando redução de 47% na taxa de recidiva local e de 37% no surgimento de metástases à distância nos pacientes submetidos a terapia combinada, além de observar redução da taxa de mortalidade pela neoplasia em 36% e da taxa de óbito geral em 29%.

Ressalta-se que ainda havia dúvida sobre o real efeito da radioterapia na obtenção de melhora das taxas de recidiva local, pois a técnica cirúrgica ainda não estava totalmente padronizada.

O “*Dutch TME trial*”⁽¹⁷⁾, publicado em 2001, finalmente demonstrou que a radioterapia neoadjuvante era responsável por reduzir as taxas de recidiva local em pacientes submetidos a cirurgia padronizada de excisão total do mesorreto. Em metanálise sobre este tema, Camma et al.⁽¹⁸⁾ também observaram redução da recidiva local, além de melhora na taxa de sobrevida global.

Estes estudos colaboraram para sedimentar a importância da associação da quimioterapia à radioterapia (QRT) no tratamento dos pacientes; porém, permanecia duvidoso o melhor momento (pré-operatório ou pós-operatório) para administração da QRT.

Essa dúvida foi resolvida por Rolf Sauer, que inicialmente publicou estudo⁽¹⁹⁾ avaliando complicações da QRT, no qual incluiu pacientes portadores de neoplasia de

reto com estadiamento TNM T3 ou T4, N + (com acometimento linfonodal) de 26 hospitais na Alemanha, randomizados em 2 grupos: radioterapia associada à quimioterapia pré-operatória e radioterapia associada à quimioterapia pós-operatória. O tratamento cirúrgico foi realizado seis semanas após o final da terapia neoadjuvante. O grupo de tratamento pós-operatório recebeu dose extra de radiação local. Os resultados mostraram baixa toxicidade (menos de 15% dos pacientes com toxicidade igual ou superior ao grau 3) e pouca influência na morbidade cirúrgica. Em publicação posterior⁽²⁰⁾, o mesmo autor mostrou taxa de recidiva local de 6% no grupo de terapia pré-operatória versus 13% no grupo de terapia pós-operatória (P=0,006), com maior toxicidade graus 3 e 4 no grupo de terapia pós-operatória: 27% vs 40%, (P=0,001), sem diferença entre os grupos quanto à sobrevida global: 76% vs 75%, (P=0,8).

Particularmente quando aplicada a tumores do reto distal, a QRT neoadjuvante (nQRT) trouxe o benefício adicional de aumentar as taxas de cirurgia com preservação esfinteriana^(20, 21).

Estabelecida a importância da terapia neoadjuvante para o tratamento das neoplasias de reto, alguns estudos procuraram estabelecer o tempo ideal entre o final do tratamento de nQRT e a cirurgia, sendo ainda hoje motivo de debate.

Observação importante sobre esse tema já havia sido realizada por Francois et al.⁽²¹⁾, que avaliaram um grupo de pacientes menos de 2 semanas após o término da nQRT e o comparou com outro grupo avaliado entre 6 e 8 semanas após o seu término, observando maior taxa de regressão tumoral no grupo de pacientes com maior tempo de intervalo. Estudo mais completo sobre o assunto foi realizado em 2009 na *Cleveland Clinic*⁽²²⁾, demonstrando que o prazo de maior resposta entre o final da nQRT e a cirurgia é de 8 semanas, havendo pequeno benefício adicional com prazo de até 12 semanas; ponto em que a taxa de resposta atinge um platô até as 32 semanas descritas no estudo.

Um importante caminho aberto pela nQRT foi a observação do surgimento de diferentes graus de regressão tumoral após a terapia, sendo que a regressão tumoral completa pode ser observada em 4,2 a 38,5% dos pacientes^(23, 24).

O termo resposta patológica completa (pCR) é utilizado para os casos em que se observa regressão tumoral completa através de exame anatomopatológico.

Constatou-se que o grupo de pacientes com pCR apresenta melhores resultados de longo prazo, com menor possibilidade de recidiva local ou à distância e maior sobrevida, possivelmente associados à biologia tumoral menos agressiva^(23, 25).

A observação de ocorrência de pCR em alguns pacientes levou à proposta de tratamento não operatório, em casos selecionados de câncer de reto, pela Disciplina de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; estratégia conhecida como “*Watch and Wait*”, baseada num programa de vigilância rigorosa dos pacientes⁽²⁶⁻²⁹⁾, assunto ainda hoje bastante controverso e sob investigação, devido à dificuldade de identificação do grau de resposta sem análise da peça cirúrgica e à possibilidade de recrescimento tumoral durante o período de observação.

Para ilustrar esta problemática, Dattani et al.⁽³⁰⁾ descrevem, em revisão sistemática de 2018, taxa de sobrevida em 3 anos de 93,5%, com risco de recrescimento tumoral de 21,6% e risco de desenvolvimento de metástases à distância de 6,8% entre os pacientes com pCR; achado compatível com revisão sistemática de outros autores⁽²⁵⁾.

Sabe-se que a resposta patológica completa é objetivamente avaliada através do espécime cirúrgico completo, não sendo identificado qualquer foco de doença no reto ou nos linfonodos regionais; porém, a identificação de resposta completa sem esta análise completa é tarefa complexa.

O termo resposta clínica completa (cCR) passou a ser usado quando ao exame físico digital do reto não há lesão tocável, à retoscopia não há lesão visível ou há apenas lesão cicatricial sem ulceração, e à ressonância magnética da pelve não se observa lesão ou há sinais de regressão sem tumor residual e sem doença extra-retal⁽³¹⁻³⁴⁾.

Entretanto, deve-se salientar que a resposta clínica completa nem sempre significa resposta patológica completa (pode haver doença residual não identificável pelos exames), e nem sempre resposta clínica incompleta significa resposta patológica incompleta (as alterações observadas nos exames podem representar fibrose / tecido cicatricial sem células tumorais viáveis).

Essa dificuldade em identificar o grau de resposta ao tratamento neoadjuvante pode ser responsável pelo recrescimento tumoral em alguns pacientes submetidos a tratamento não operatório⁽²⁵⁾, e pode ser ilustrada por estudo realizado nesta instituição⁽³⁴⁾, que avaliou 118 pacientes submetidos a nQRT por neoplasia de reto e identificou 6 pacientes com cCR (2 foram operados e em 1 deles havia neoplasia residual na peça) além de 112 pacientes com resposta clínica incompleta (em 18 deles não havia tumor residual na peça).

Tornou-se evidente, então, a necessidade de buscar fatores clínicos, radiológicos ou laboratoriais prognósticos para identificação destes pacientes que teriam melhor resposta ou até resposta completa à nQRT. Este conhecimento permitiria identificar um subgrupo de pacientes que teriam comportamento biológico tumoral menos agressivo, podendo-se calibrar a agressividade do tratamento multimodal e até poupar um determinado subgrupo com resposta completa de procedimento cirúrgico mutilante.

O estudo anatomopatológico da área cicatricial pós nQRT pode ser realizado através da realização de biópsias locais ou de ressecção local de espessura total do reto; mas tais procedimentos não resolvem a questão, uma vez que pode haver acometimento linfonodal ou depósitos microscópicos de células tumorais residuais^(35, 36).

A busca de potenciais fatores preditores de resposta à terapia neoadjuvante seguiu por análise das características clínicas dos pacientes, características histológicas e radiológicas dos tumores, além de vários marcadores moleculares.

Ryan et al.⁽³⁷⁾ publicaram revisão sistemática sobre o assunto em 2016 e verificaram que algumas características clínicas pré-tratamento como: bom grau de diferenciação tumoral, tumores pequenos, estádios T e N iniciais nos exames de imagem, tumores não circunferenciais e não ulcerados e níveis baixos de antígeno carcinoembrionário (CEA), poderiam estar relacionados à maiores taxas de resposta completa, porém, os estudos avaliados apresentavam baixa sensibilidade e especificidade, além de resultados contraditórios quando comparados a outras séries de dados⁽³⁸⁾.

Em metanálise publicada em 2020, Huang et al.⁽³⁹⁾ descreveram como fatores relacionados à resposta patológica completa: idade avançada ($p=0,0002$), tumores próximos à borda anal ($p<0,00001$), tumores pequenos ($p<0001$), ausência de envolvimento linfonodal ($p<0000,1$) e tempo entre o final da QRT neoadjuvante e a cirurgia maior que 8 semanas ($p=0,002$), com ressalvas ao fator idade devido a possível viés de seleção.

Do ponto de vista radiológico, a ressonância nuclear magnética da pelve (RNM) mostra-se limitada para avaliar resposta a nQRT, com sensibilidade de 61,1% para detectar resposta patológica completa, e moderado poder diagnóstico para avaliação de grau de resposta tumoral (TRG)⁽⁴⁰⁾.

Da mesma forma, achados referentes ao exame de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons também não se mostraram efetivos para prever resposta⁽³⁷⁾, porém com dados sugerindo que exames sequenciais realizados 6 e 12 semanas após o término da nQRT poderiam indicar maior chance de resposta completa⁽⁴¹⁾.

Mais recentemente, técnicas de endoscopia associadas à microscopia confocal (endomicroscopia confocal a laser) também começaram a ser estudadas na avaliação dos tumores pós nQRT com resultados animadores em nossa instituição⁽⁴²⁾.

Além dos fatores já descritos, muitos marcadores moleculares também foram investigados, podendo-se citar proteínas de reparo de DNA⁽⁴³⁾, proteínas envolvidas na proliferação celular⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, angiogênese⁽⁴³⁾ e apoptose^(47, 48) (p53, KRAS, EGFR, VEGF, Bax e Bcl-2), sendo que nenhuma delas relacionou-se definitivamente com resposta à nQRT, indicando que os variados tipos e graus de resposta dos tumores evidenciam que a sensibilidade à terapia depende de múltiplos genes (devido à heterogeneidade celular tumoral) e múltiplos outros fatores que existem no microambiente local.

Pensando nestes fatores celulares e moleculares locais, deve-se atentar para o principal deles: a inflamação.

1.2 Inflamação

A inflamação ocorre como resposta a um determinado fator como ferimento ou infecção, desencadeando uma variedade de estímulos químicos que provocam migração de glóbulos brancos para o local.

A migração dos neutrófilos para os tecidos pode ser resumida da seguinte forma: primeiro há ativação de moléculas de adesão que permitem a rolagem das células pelo endotélio vascular, seguida por ativação de integrinas leucocitárias mediadas por citocinas e moléculas ativadoras de leucócitos; a seguir, moléculas de adesão celular endotelial vascular imobilizam os neutrófilos no endotélio e, finalmente, ocorre migração destes para o local da lesão através do endotélio, facilitada por proteases extracelulares.

Neutrófilos e eosinófilos são as primeiras células recrutadas como efetores da resposta inflamatória aguda. Os monócitos vêm a seguir, diferenciam-se em macrófagos nos tecidos e são guiados por fatores quimiotáticos. Após sua ativação, secretam citocinas e fatores de crescimento que regulam o microambiente local. Os mastócitos também são importantes, pois liberam mediadores inflamatórios como histamina, citocinas, proteases e mediadores lipídicos⁽⁴⁹⁾.

No microambiente local há um balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, e alterações neste equilíbrio determinam a interrupção da inflamação ou a sua cronicidade.

1.3 Inflamação e câncer

O câncer é resultado de um conjunto de erros nas tarefas de replicação e migração celular. Seu desenvolvimento é um processo de múltiplas etapas (iniciação, promoção, angiogênese e metastatização) envolvendo alterações genéticas e ambientais⁽⁵⁰⁾.

Classicamente, as alterações na fisiologia celular para o desenvolvimento tumoral envolvem seis etapas:

- 1 - Autossuficiência em fatores de sinalização de crescimento.
- 2 - Insensibilidade a inibidores de fatores de crescimento.
- 3 – Evasão de apoptose (morte celular programada).
- 4 - Aquisição de potencial de replicação ilimitado.
- 5 - Angiogênese sustentada.
- 6 - Aquisição de capacidade de invasão tecidual e metástases.

Para cada uma destas etapas existem mecanismos de defesa do organismo e, para que o câncer se desenvolva, todas essas linhas de defesa devem ser rompidas⁽⁵¹⁾.

A associação entre inflamação e câncer vem sendo estudada desde 1863, quando Rudolf Virchow⁽⁵²⁾, através da observação de infiltrado leucocitário em tecidos neoplásicos, sugeriu que o câncer surge em locais de inflamação crônica. Os dados sobre esta associação acumularam-se, podendo-se citar também o conceito de que os tumores são, de certa forma, feridas que não cicatrizam, frente à observação de persistência da proliferação celular na vigência de dano ao DNA, mutações ou microambiente rico em células inflamatórias com fatores de crescimento⁽⁵³⁾.

Três outras alterações na fisiologia celular durante a carcinogênese relacionam-se diretamente à inflamação⁽⁵⁴⁾:

- 1 - Capacidade de prosperar em microambiente de inflamação crônica.
- 2 - Capacidade de evitar reconhecimento pelo sistema imunológico.
- 3 - Capacidade de supressão da reatividade imunológica.

A inflamação pode atuar tanto na iniciação quanto na promoção tumoral. A iniciação tumoral é a aquisição, pela célula sadia, da primeira mutação que iniciará o processo de desenvolvimento tumoral; já a promoção é o processo de desenvolvimento tumoral a partir da mutação inicial^(51, 55).

Os exemplos da associação entre inflamação crônica e neoplasia são vários. No trato gastrointestinal destacam-se as associações entre o câncer colorretal e a doença inflamatória intestinal; entre o câncer de esôfago e a esofagite de refluxo gastresofágico e esôfago de Barrett; entre o câncer de vesícula biliar e a colecistite crônica; entre o câncer gástrico e a gastrite crônica e úlceras, e entre o câncer hepatocelular e as hepatites crônicas⁽⁴⁹⁾.

Outra possível evidência é a observação de redução de incidência e mortalidade de câncer (dentre eles o câncer colorretal) com o uso de anti-inflamatórios não esteroidais^(56, 57).

Para compreender melhor a relação entre inflamação e câncer é essencial o estudo do microambiente tumoral (MT), descrito a seguir:

O MT é o ecossistema microscópico de um tumor sólido, composto por células tumorais e células não tumorais infiltrativas banhadas por inúmeros tipos moleculares, no qual as interações celulares ocorrem de forma a regular expressão gênica, causando alterações fenotípicas locais⁽⁵⁸⁾. Essa ação regulatória também gera pressão seletiva que tem papel fundamental na progressão tumoral e metastatização⁽⁵⁹⁾.

Ressalta-se que várias moléculas bioativas no MT podem apresentar características tanto pró quanto antitumorais. Estas características são influenciadas pelo tipo tumoral, seu estágio de progressão e receptores expressos pelas células locais. São exemplos destas moléculas: TGF- β , NF κ B, TNF α ⁽⁵⁸⁾.

Também são características do MT a hipóxia, a acidose e a necrose local^(60, 61); em especial a hipóxia, que está presente em praticamente todos os tumores sólidos, influenciando células tumorais e a composição do MT. A hipóxia aumenta a instabilidade genética, altera a expressão genética e causa pressão seletiva local, favorecendo células tumorais resistentes que, por sua vez, aumentam a hipóxia local culminando num círculo vicioso pró-tumoral^(62, 63).

Considerando o exposto acima, percebe-se que as interações celulares e moleculares no MT são numerosas e altamente complexas. Dado que o MT é compartilhado por vários elementos celulares, descreve-se, a seguir, especificamente o papel das células inflamatórias - foco do presente trabalho.

1.3.1 O papel dos neutrófilos

As células granulocíticas polimorfonucleares receberam o nome de neutrófilos do cientista Paul Ehrlich⁽⁶⁴⁾, baseado no fato de somente captarem corantes neutros. As outras células granulocíticas são os basófilos e os eosinófilos.

São produzidos cerca de 10^{11} neutrófilos por dia em condições normais⁽⁶⁵⁾. Eles representam cerca de 50 a 70% dos leucócitos; desenvolvem-se predominantemente na medula óssea (também podem desenvolver-se no baço), a partir de células tronco hematopoiéticas, tendo como principais ativadores: o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF).

Seu desenvolvimento inicia-se com mieloblastos que diferenciam-se em promielócitos (com grânulos primários), mielócitos, metamielócitos (com grânulos secundários) até chegar ao neutrófilo multissegmentado (com grânulos terciários)⁽⁶⁶⁾.

Seus grânulos armazenam variadas enzimas como mieloperoxidase, elastase, defensinas, metaloproteinases de matriz, dentre outras, que tem função de combate à infecções e mediação para resolução do processo inflamatório⁽⁶⁷⁾.

Os neutrófilos permanecem retidos na medula óssea (somente cerca de 2% dos neutrófilos maduros são encontrados na circulação em condições normais)⁽⁶⁸⁾, e são liberados na circulação somente após sua diferenciação final, conforme estímulo por citocinas e expressão de ligantes para receptor de quimiocina tipo 2^(69, 70).

Seu número circulante é mantido por mecanismo de feedback entre células e citocinas (IL-23 e IL-17) estimulantes e inibitórias agindo sobre a produção de G-CSF⁽⁷¹⁾. O balanço de neutrófilos na circulação também é influenciado por fatores intestinais, visto

que bactérias comensais podem aumentar a produção de IL-17 e citocinas derivadas de enterócitos podem inibir esta produção^(72, 73).

Sabe-se que, na presença de tumores, dentre eles os tumores colorretais, há aumento do número de neutrófilos circulantes na corrente sanguínea⁽⁷⁴⁾. Uma explicação para este aumento é que as células tumorais e até mesmo células inflamatórias no MT, como os macrófagos associados ao tumor, produzem citocinas que estimulam liberação de neutrófilos da medula óssea, sobrepondo-se aos sinais de retenção destas células naquele local⁽⁷⁵⁾.

Quando o estímulo é intenso o bastante, pode até haver liberação de células com diferenciação incompleta a partir da medula óssea. Uma vez liberados na circulação, sua meia vida é de cerca de 7 horas, que pode ser aumentada para cerca de 17 horas na presença de tumor, proporcionando mais tempo para sua participação nos processos tumorais⁽⁷⁶⁾.

Dados atuais sugerem que os neutrófilos têm papel importante em todas as etapas da carcinogênese, desde a iniciação, passando pelo crescimento tumoral até a sua metastatização⁽⁷¹⁾.

Sabe-se que os neutrófilos podem apresentar características fenotípicas diferentes, dependendo da presença de alguns fatores derivados dos tumores. TGF- β e G-CSF estimulam funções pró-tumorais e pró-metastáticas, enquanto IFN- β age como inibidor deste fenótipo pró-tumoral dos neutrófilos^(77, 78).

Importante mencionar, neste ponto, algumas evidências de efeitos antitumorais ligados aos neutrófilos, podendo-se citar a ativação de neutrófilos antitumorais recrutados por ligantes de quimiocinas - (CXCL1, CXCL2 e CXCL5) cuja expressão é induzida por hipóxia no MT⁽⁷⁹⁾, e a liberação de TNF derivado de endotélio, que leva à produção de

catalisadores de produção de óxido nítrico e espécies reativas de nitrogênio (iNOS), com efeitos citotóxicos nas células tumorais⁽⁸⁰⁾.

Entretanto, as evidências mais numerosas apontam predominantemente para o efeito pró-tumoral dos neutrófilos, que será melhor explorado a seguir.

A participação dos neutrófilos na iniciação tumoral pode estar relacionada à sua capacidade de produção de moléculas como as proteases (elastase derivada de neutrófilos), espécies reativas de oxigênio e nitrogênio capazes de causar danos celulares⁽⁷¹⁾.

Na promoção e crescimento tumoral, os neutrófilos são estimulados pelo aumento de IL-17, produzido por linfócitos T CD4⁺ que, por sua vez, são ativados por TNF produzido pelas células tumorais⁽⁸¹⁾; sua participação estimula a proliferação tumoral por sinalização molecular ativada via secreção de elastase⁽⁸²⁾.

Os neutrófilos também convertem células senescentes em células proliferativas através do antagonista de receptor de IL-1⁽⁸³⁾ e causam efeito imunossupressor através de sinalização por iNOS, ARG1 e TGF- β , levando à inativação da resposta imune antitumoral mediada por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺⁽⁸⁴⁾.

A angiogênese e o remodelamento da matriz extracelular também tem participação dos neutrófilos, através da secreção da proteína BV8 e de matriz metaloproteinase 9 (MMP-9), que ativa o fator A de crescimento vascular endotelial (VEGFA)^(71, 85-87).

A participação dos neutrófilos nos processos metastáticos ocorre de várias formas:

- Indução da migração de células tumorais através de células endoteliais por ação de TNF, além da expressão de MMP-9 e BV8 que induzem permeabilidade vascular e facilitam a disseminação de células tumorais^(71, 87, 88).

- Inibição de atividades antitumorais dos linfócitos T CD8+ através da produção de iNOS⁽⁸⁹⁾.
- Bloqueio de atividades antitumorais de células “*natural killer*”(NK)⁽⁸⁴⁾.
- Captura de células tumorais circulantes através da molécula de superfície CD11b ou pela liberação de matriz fibrilar extracelular, associada ao aumento da formação de metástases^(90, 91).

1.3.2 O papel dos linfócitos

Linfócitos são células do sistema imunológico adaptativo e originam-se a partir de células tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea, via progenitores linfoides comuns, e pertencem ao sistema linfático. Sua linhagem é diferente da eritróide e mielóide; os progenitores linfóides comuns podem diferenciar-se em linfócitos B e T dependendo do estímulo a que forem submetidos⁽⁹²⁾.

Também integrantes da linhagem linfoide, as células “*natural killer*” (NK) são elementos essenciais da resposta imunológica inata, atuando na linha de frente contra tumores e infecções virais.

Elas possuem capacidade de eliminar células sem ativação prévia e foram descritas na década de 1970⁽⁹³⁾; desenvolvem-se na medula óssea, em tecidos linfoides periféricos e órgãos não linfoides a partir de seus precursores⁽⁹⁴⁾.

Além das células NK, foram descritas outras linhagens celulares linfoides que participam ativamente da resposta inata, as células linfoides inatas, cujo papel é produzir citocinas em padrões que mimetizam os linfócitos T auxiliares da resposta imunológica adaptativa⁽⁹⁵⁾.

Os linfócitos B sofrem maturação na medula óssea e diferenciação nos linfonodos. A maior parte das células B maduras são linfócitos B foliculares e localizam-se nos folículos linfoides dos linfonodos e no baço. Estas células estimulam a resposta T linfocítica. Células B extra foliculares podem ser ativadas por linfócitos T-auxiliadores (*T-helper*), sofrer diferenciação e secretar anticorpos ou migrar de volta para os folículos e proliferar-se para formar centros germinativos⁽⁹⁶⁾.

Os precursores dos linfócitos T migram da medula óssea para o timo para completar sua maturação. No timo estas células sofrem seleção positiva e negativa e diferenciam-se em células CD4⁺ CD8⁻ ou CD4⁻ CD8⁺; somente 1 a 3% delas completam todos os estágios no timo e são liberadas na circulação sanguínea. Uma vez na circulação, os linfócitos T migram para tecidos linfoides periféricos como linfonodos, onde podem ser ativadas por antígenos^(97, 98).

Linfócitos T CD4⁺ diferenciam-se em células imunossupressoras ou regulatórias (Treg) ou células inflamatórias efetoras/auxiliadoras (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh), cada uma com diferentes características metabólicas⁽⁹⁹⁾. As principais linhagens efetoras/auxiliadoras são Th1 e Th2.

Os linfócitos T CD4⁺ Th1 são induzidos por células NK e/ou dendríticas e produzem citocinas inflamatórias como IFN γ e TNF α ou TNF β , sendo responsáveis pela morte de antígenos intracelulares e pela manutenção da resposta auto-imune^(100, 101).

Os linfócitos T CD4⁺ Th2 são induzidos por IL-4 de células dendríticas e produzem citocinas como IL-4, IL-5, IL-13, associadas à produção de IgE e resposta eosinofílica, controlando imunidade extracelular a parasitas e resposta inflamatória alérgica^(101, 102).

Os linfócitos T CD8⁺ tem grande importância na resposta imunológica antitumoral; são induzidos por reconhecimento de antígenos do complexo de

histocompatibilidade principal classe 1 (MHC-1) nos órgãos linfáticos periféricos. A principal linhagem destas células é a de linfócitos T citotóxicos, responsáveis diretos pela eliminação de células infectadas, danificadas ou disfuncionais, incluindo as células tumorais^(103, 104). Pode-se citar outras linhagens com atividade antitumoral, como a Tc9 que produz IL-9, e a Tc17 que produz IL-17, com propriedades pró-inflamatórias e antitumorais^(104, 105).

A resposta imunológica inata parece ter ação antitumoral, observando-se infiltração tumoral por células NK, NK tipo T e linfócitos T $\gamma\delta$ em contraste com a infiltração por macrófagos, geralmente associada a efeitos pró tumorais⁽¹⁰⁶⁾.

A resposta antitumoral específica é gerada pelo sistema imunológico adaptativo. As células NK, NK tipo T e macrófagos promovem lise de células tumorais; as células dendríticas então capturam, processam e apresentam os antígenos resultantes para os linfócitos T CD4+ através do MHC classe 2 ou para os linfócitos T CD8+ através do MHC classe 1.

A atividade dos linfócitos no MT é composta por um balanço entre efeitos anti e pró-tumorais. Os linfócitos T CD8+ ativados reconhecem e realizam lise celular das células tumorais. Os linfócitos T CD4+ ativados modulam a resposta imunológica antitumoral, diferenciando-se em 2 linhagens: Th1 que secreta citocinas como IL-2 e IFN γ , promovendo resposta antitumoral e Th2 cuja resposta é associada ao crescimento tumoral. Cita-se ainda a presença dos linfócitos T CD4+ regulatórios (Treg), que podem inibir a resposta imunológica antitumoral, representando mecanismo de escape para as células tumorais⁽¹⁰⁷⁾.

MacCarty e Mahle⁽¹⁰⁸⁾, em 1920, observaram sobrevida maior em pacientes portadores de câncer gástrico que apresentavam infiltrado linfocítico intratumoral. Este achado ganhou maior importância com a observação de que a densidade e a localização

de linfócitos T citotóxicos e de memória são melhores preditores de sobrevida em pacientes com câncer colorretal do que a classificação AJCC/UICC-TNM^(109, 110). Assim, Galon et al.⁽¹¹¹⁾ criaram o conceito de “contexto imunológico” para câncer colorretal, ressaltando a importância da natureza, densidade, orientação funcional imunológica e localização dos infiltrados inflamatórios para o prognóstico destes pacientes, conceito que depois foi expandido para a maioria dos tumores sólidos^(109, 112).

Ainda nesse sentido, foi criado o “imunoescore”, que consiste na classificação dos infiltrados linfocitários baseada na densidade da população específica de linfócitos no centro do tumor e na sua margem invasiva, com valor preditivo de sobrevida e recorrência⁽¹¹³⁾.

1.3.3 O papel dos monócitos

Os monócitos são leucócitos mononucleares que se desenvolvem na medula óssea a partir de célula progenitora mieloide comum e são liberados na circulação sanguínea, onde circulam por alguns dias antes de infiltrarem diversos tecidos do corpo, inclusive os tumorais⁽¹¹⁴⁾. Representam 5 a 10% dos leucócitos do sangue circulante e apresentam grande heterogeneidade, com variados tamanhos e morfologia nuclear, além de graus diferentes de granularidade.

Os monócitos são importantes para a resposta imunológica tanto inata quanto adaptativa, e dão origem às células dendríticas, aos osteoclastos e aos macrófagos⁽¹¹⁵⁾.

Os macrófagos foram descritos pelo zoologista Russo Élie Metchnikoff⁽¹¹⁶⁾ em 1883. Estas células podem ter características fenotípicas diferentes de acordo com sua ativação.

Os macrófagos M1 (ativados via interferon) produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem células Th1, desempenhando papel inflamatório antineoplásico durante a iniciação e desenvolvimento tumoral. Com a progressão tumoral, os macrófagos M1 tornam-se macrófagos pró-tumorais M2, produzem antagonistas de receptores de IL-1 e a quimiocina derivada de macrófagos, que atrai linfócitos Th2, colaborando com remodelação tecidual, angiogênese e supressão imunológica adaptativa, o que contribui para o crescimento e a disseminação tumoral^(52, 117).

Juntamente com mastócitos e linfócitos T, os macrófagos são células que compõem o infiltrado leucocitário tumoral, neste caso chamados de macrófagos associados ao tumor⁽¹¹⁸⁾.

Os macrófagos associados ao tumor estão incluídos no MT com fenótipo pró-neoplásico, ligados à promoção do crescimento tumoral, remodelação tecidual, estímulo à angiogênese e supressão de imunidade adaptativa⁽¹¹⁹⁻¹²¹⁾. A sinalização, como já mencionada anteriormente, ocorre através das próprias células tumorais ou de linfócitos T regulatórios, com secreção de M-CSF, IL-10 e TGF- β ^(119, 120, 122).

A associação entre infiltrado leucocitário tumoral e angiogênese ocorre através do VEGF, que exerce forte atração sobre os monócitos em direção ao tumor primário ou aos locais de metástases^(121, 123); uma vez nestes locais, essas células estimulam angiogênese de forma independente do VEGF pela secreção de fatores pró-angiogênicos^(88, 124, 125).

1.3.4 O papel das plaquetas

As plaquetas foram primeiro descritas microscopicamente por Giulio Bizzozero em 1882⁽¹²⁶⁾ e associadas à recomposição de danos vasculares. Originam-se de células chamadas megacariócitos na medula óssea e caracterizam-se por serem pequenas células

anucleadas, com tamanho entre 20 a 25 microns e duração de vida média entre 7 e 10 dias⁽¹²⁷⁾.

Sua membrana é composta por fosfolípidos cobertos por glicoproteínas e integrinas, responsáveis pela hemostasia mediada pelas plaquetas. Possui receptores como GP Ib-IX-V, GPVI e GP IIb-IIIa ligados à adesão e agregação plaquetária^(128, 129) e 3 tipos de grânulos: grânulos densos com amplificadores de ativação de plaquetas como serotonina e difosfato de adenosina, grânulos com proteínas agonistas da ativação plaquetária e participantes dos processos de coagulação e grânulos lisossomais com glicosidases e proteases⁽¹³⁰⁾.

Há crescentes dados da relação entre plaquetas e câncer, mas já em 1865, Armand Trousseau⁽¹³¹⁾ percebeu associação entre hipercoagulabilidade e neoplasia oculta, enquanto Leopold Riess⁽¹³²⁾, em 1872, associou trombocitose com tumores sólidos. Mais tarde, Gasic et al.⁽¹³³⁾ trouxeram novas evidências sobre essa interação, relacionando trombocitopenia induzida com redução de metástases, enquanto Stone et al.⁽¹³⁴⁾ descreveram um circuito no qual o tumor e o próprio hospedeiro produzem citocinas trombopoéticas que levam a trombocitose que, por sua vez, estimula o crescimento tumoral.

Mais recentemente, novos estudos mostraram relação entre número elevado de plaquetas e menor tempo de sobrevida livre de doença e menor sobrevida global em diversos tipos de tumores, incluindo os colorretais^(135, 136).

O número elevado de plaquetas, associado à alteração de suas funções, também relaciona-se ao elevado índice de trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar em pacientes portadores de neoplasias⁽¹³⁷⁾.

As plaquetas interagem com os tumores de diversas formas, exercendo papel tanto no MT como na circulação sistêmica.

Na circulação sistêmica, as plaquetas interagem com as células tumorais circulantes, colaborando com a sua evasão do sistema imunológico inato^(138, 139), elas também podem interferir no reconhecimento das células tumorais pelas células NK⁽¹⁴⁰⁾.

No MT as plaquetas aumentam a adesividade das células tumorais ao endotélio microvascular⁽¹⁴¹⁾, induzem quebra da barreira endotelial, facilitando migração de células tumorais e metástases⁽¹⁴²⁾, e secretam citocinas como CXCL5 e CXCL7, que aumentam o recrutamento de granulócitos⁽¹⁴³⁾.

Outra função importante das plaquetas na carcinogênese é a estimulação de angiogênese. Por ser importante fonte de fatores angiogênicos circulantes, principalmente de VEGF, elas agem regulando a angiogênese tumoral e a integridade vascular⁽¹⁴⁴⁾.

1.4 Elementos circulantes no sangue periférico como marcadores de resposta inflamatória sistêmica e sua relação com câncer

Já na década de 1970, houve observação de que pacientes com neoplasias de cólon avançadas apresentavam número reduzido de linfócitos circulantes⁽¹⁴⁵⁾; hoje, à luz de novos conhecimentos, percebe-se que há clara interação entre as células inflamatórias e os processos de carcinogênese.

Tal relação fica evidente estudando-se o MT, porém, tais interações também podem ser medidas de forma sistêmica utilizando-se as células circulantes no sangue periférico, levando-se em conta a característica predominante pró ou antitumoral de cada linhagem celular: os neutrófilos e plaquetas, mais associados às funções pró-tumorais e os linfócitos mais associados às funções antitumorais, conforme discutido nos tópicos anteriores.

Marcadores inflamatórios modernos podem basear-se em identificação molecular de substâncias por biópsias líquidas ou avaliação de expressão genética, porém tais marcadores ainda são pouco estudados, com disponibilidade restrita e elevado valor financeiro.

A partir das observações acima e da necessidade de buscar novos biomarcadores tumorais que sejam amplamente disponíveis e de baixo custo, ganharam destaque as linhas de investigação que abordam as relações entre os componentes celulares inflamatórios no sangue periférico, a saber: a razão neutrófilo-linfócito (RNL), a razão plaqueta-linfócito (RPL) e a razão linfócito-monócito (RLM), com potencial de trazer grande valor diagnóstico com custo extremamente baixo, utilizando-se apenas dados dos hemogramas dos pacientes.

Estes biomarcadores, principalmente a RNL e a RPL, são marcadores independentes de prognóstico em várias neoplasias sólidas, incluindo câncer colorretal, e serão caracterizados a seguir.

1.4.1 A razão neutrófilo-linfócito (RNL)

A RNL é obtida pela divisão do número absoluto de neutrófilos pelo de linfócitos observados no sangue periférico. Inicialmente utilizada como marcador inflamatório em doenças infecciosas e pacientes críticos^(146, 147), observações posteriores mostraram sua utilidade como preditor de morbidade e mortalidade em várias doenças, inclusive doenças cardiovasculares⁽¹⁴⁸⁾, e houve grande impulso para o estudo deste marcador como fator prognóstico em diversas neoplasias.

Estudo realizado nesta instituição por Szor et al.⁽¹⁴⁹⁾, mostrou relação entre RNL elevada e pior sobrevida em pacientes portadores de câncer gástrico. Templeton et al.⁽⁷⁴⁾

demonstraram, em metanálise, que pacientes com RNL elevada tem pior sobrevida em neoplasias gastroesofágicas, hepáticas, colorretais, renais, pulmonares, entre outras.

Especificamente quanto ao câncer colorretal, Walsh et al.⁽¹⁵⁰⁾ demonstraram, em 2005, que pacientes com RNL maior que 5 apresentavam pior sobrevida. Outro estudo publicado em 2017⁽¹⁵¹⁾, avaliou 984 pacientes tratados por neoplasia de reto e mostrou relação entre RNL baixa, RLM e RPL elevadas com maior sobrevida livre de doença.

A utilização da RNL pré-operatória como preditora de resposta a tratamento neoadjuvante foi descrita por Sato et al.⁽¹⁵²⁾ em 2012, em estudo com 83 pacientes recebendo neoadjuvância para neoplasia de esôfago. A RNL pré-operatória elevada (maior que 2,2) e a presença de metástases linfonodais foram preditores independentes de resposta ruim e retardada ao tratamento, com taxa de resposta de 21% versus 56% nos pacientes com RNL baixa (menor que 2,2). Esta relação foi posteriormente confirmada para vários tipos de tumores sólidos⁽¹⁵³⁾.

Para o câncer de reto, os dados ainda são escassos e conflitantes. A associação entre RNL menor que 5 e maior índice de resposta patológica completa pós nQRT já foi demonstrada⁽¹⁵⁴⁾, porém Shen et al.⁽¹⁵⁵⁾ observaram que RNL maior que 2,8 associou-se a menor sobrevida global e livre de doença, sem relação com índice de resposta a nQRT; Ik Yong Kim et al.⁽¹⁵⁶⁾ demonstraram que RNL elevada é preditor de resposta ruim à nQRT e prognóstico desfavorável; achado corroborado por metanálise publicada em 2018 por Li et al.⁽¹⁵³⁾

1.4.2 A razão plaqueta-linfócito (RPL)

A RPL é obtida pela divisão do número absoluto de plaquetas pelo de linfócitos observados no sangue periférico.

Conforme já descrito anteriormente, observa-se número elevado de plaquetas em pacientes com câncer. Este número elevado indica pior prognóstico em diferentes tipos de tumores, dentre eles os ginecológicos⁽¹⁵⁷⁾, pulmonares⁽¹⁵⁸⁾, urológicos⁽¹⁵⁹⁾ e colorretais⁽¹⁶⁰⁾. A hipótese é que a RPL elevada indica intensa resposta inflamatória no paciente, que se associa a características tumorais mais agressivas⁽¹⁶¹⁾. Especificamente sobre neoplasia de reto, Belluco et al.⁽¹⁶²⁾ observaram relação independente entre boa taxa de resposta à nQRT e número de plaquetas não elevado.

Há poucos estudos abordando o tema RPL e resposta à nQRT, também com escassos resultados conflitantes na literatura. São descritas tanto a relação entre RPL elevada e resposta ruim ao tratamento⁽¹⁶³⁾ como a falta de associação entre RPL e predição de resposta completa à nQRT⁽¹⁶⁴⁾; observações que reforçam a necessidade de maior estudo sobre o tema.

1.4.3 A razão linfócito-monócito (RLM)

A RLM é obtida pela divisão do número absoluto de linfócitos pelo de monócitos observados no sangue periférico. Trata-se de marcador menos estudado em relação à RNL e RPL, porém com plausibilidade biológica uma vez que pode demonstrar associação de linfopenia (marcador de baixa resposta imunológica) e monocitose (possível marcador pró-tumoral, pela ação destas células no MT), conforme descrito anteriormente.

Encontra-se relato de sua utilidade como marcador inflamatório em estudo de 2012⁽¹⁶⁵⁾, que observou sua capacidade em identificar pacientes de risco elevado em tratamento por linfoma e também como preditor de sobrevida em pacientes com neoplasias colorretais^(166, 167), havendo estudo sugerindo até a superioridade deste marcador em relação a outros classicamente mais utilizados⁽¹⁶⁸⁾.

A utilização deste marcador como preditor de resposta à nQRT ainda não foi devidamente estudada e, após busca extensa na literatura, observa-se que poucos autores se debruçaram sobre este tema, obtendo resultados conflitantes. Li et al.⁽¹⁶⁹⁾ mostraram que RLM baixo é capaz de prever pior resposta à nQRT, enquanto Jung et al.⁽¹⁵¹⁾ não observaram associação entre RLM e índice de resposta completa à nQRT.

Conforme exposto acima, percebe-se que o estudo das relações entre as células inflamatórias circulantes no sangue periférico e sua relação com a resposta ao tratamento neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto apresenta resultados escassos e conflitantes, muito frequentemente oriundos de populações orientais.

Considerando que a utilização de nQRT em tumores de reto tornou-se muito frequente e que há possibilidade de oferecer aos pacientes tratamentos menos invasivos ou mutilantes para aqueles com boa resposta, e que até o momento não existe ferramenta que possa adequadamente prever o grau de resposta tumoral ao tratamento, o estudo de potenciais fatores preditores de baixíssimo custo e amplamente disponíveis pode representar grande benefício no manejo destes pacientes.

2 Objetivo

Estudar, dentre os pacientes com neoplasia de reto submetidos a quimio e radioterapia neoadjuvantes (nQRT), a relação entre os marcadores de resposta inflamatória sistêmica no sangue periférico (RNL, RPL e RLM) e os graus de resposta ao tratamento neoadjuvante, de acordo com a classificação TRG.

3 Casuística e Métodos

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo observacional, retrospectivo, uni-institucional, de banco de dados eletrônico coletado prospectivamente de pacientes tratados no Instituto do Câncer do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICESP-HCFMUSP), através de dados clínicos, laboratoriais e patológicos.

3.2 População estudada

Foram estudados pacientes com diagnóstico de neoplasia de reto submetidos à nQRT, tratados pelo Serviço de Coloproctologia do ICESP-HCFMUSP, entre junho de 2011 e janeiro de 2016.

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por cirurgiões do serviço, especializados no tratamento do câncer de reto. As condutas (operatórias ou não operatórias) foram definidas através de reuniões multidisciplinares realizadas semanalmente no hospital.

Os critérios de inclusão e exclusão do estudo são apresentados a seguir.

3.2.1 Critérios de inclusão

- a) Idade: sem restrição.
- b) Diagnóstico de neoplasia de reto.
- c) Estadiamento inicial T (T2, T3 ou T4); N (N0, N1 ou N2), M0 (sem evidência de doença metastática comprovada antes do início da nQRT).
- d) Esquema de nQRT composto por 28 sessões de 5-Fluouracil associado a leucovorin, concomitante a radioterapia nas semanas 1 e 5, completando um total de 5040 cGy.
- e) Submetido a tratamento radical, composto por nQRT seguida por tratamento cirúrgico radical.
- f) Submetido a protocolo de acompanhamento clínico não operatório após o término da nQRT, no caso de resposta clínica completa, desde que não tenha apresentado recrescimento tumoral durante o seguimento clínico mínimo de 1 ano. Estes pacientes não possuem dados anatomopatológicos e foram classificados como TRG 0 para fins de análise estatística.

3.2.2 Critérios de exclusão

- a) Pacientes eleitos para tratamento paliativo.
- b) Pacientes imunossuprimidos (portadores de SIDA, em uso corticoterapia ou imunossupressores).
- c) Pacientes em vigência de infecção ou em uso de antibioticoterapia ou imunomoduladores no período pré-operatório.
- d) Neoplasia de reto recidivada.

- e) Recrescimento de neoplasia nos pacientes que foram selecionados para observação por resposta completa após nQRT.
- f) Neoplasia irressecável durante procedimento cirúrgico.
- g) Não realização de nQRT por qualquer motivo.
- h) Aplicação de nQRT diferente do padrão estabelecido nos critérios de inclusão.
- i) nQRT incompleta por toxicidade ou qualquer outro motivo.
- j) Realização de tratamento nQRT em outro serviço de saúde.
- k) Realização de tratamento cirúrgico após o tratamento nQRT em outro serviço de saúde.
- l) Prazo maior que 32 semanas entre o final da nQRT e o tratamento cirúrgico por qualquer motivo.
- m) Perda de seguimento após nQRT.
- n) Ausência de hemograma nos 3 meses anteriores ao início da nQRT.

3.3 Aprovação na Comissão de Ética

A autorização para realização do presente estudo no ICESP-HCFMUSP foi obtida em 10 de setembro de 2018, com registo NP: 1372/18 (Anexo A).

A aprovação do presente estudo foi realizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, através de parecer consubstanciado número 3.213.540, registrado na Plataforma Brasil, CAAE: 02512818.2.0000.0065, aprovado em 21 de março de 2019 (Anexo B).

3.4 Termo de consentimento

Tratando-se de um estudo retrospectivo, com metodologia consistindo em análise de prontuários e dados de atendimento de pacientes, foi obtida isenção da obtenção do termo de consentimento pré-informado.

3.5 Coleta de dados

Os dados foram obtidos através de consultas (retrospectivas) ao prontuário eletrônico dos pacientes (prospectivamente alimentado).

Os dados dos hemogramas utilizados foram os mais recentes, dentro do período de até 3 meses antes do início da nQRT.

3.5.1 Variáveis clínicas e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais coletados seguem descritos a seguir.

- a) Número de registro hospitalar (RGHC-FMUSP).
- b) Sexo: masculino ou feminino.
- c) Idade: em anos, calculada desde a data de nascimento até a data de início da nQRT.
- d) Comorbidades: número absoluto de doenças coexistentes.
- e) Medicações: uso ou não uso de medicação (por classe de medicamentos): anti-hipertensivo, hipoglicemiante, analgésico, anti-inflamatório não hormonal (AINH), broncodilatador, antiácido ou inibidor de bomba de prótons (IBP), opioide,

vitaminas, estatina, antiagregante plaquetário e/ou anticoagulante, antidepressivo ou outros medicamentos.

- f) Tabagismo: sim, não ou ex-tabagista.
- g) Volume de tabaco consumido: número absoluto (maços-ano), calculado através do número de maços consumidos por dia multiplicado pelo número de anos de consumo do tabaco).
- h) Etilismo: sim, não ou ex-etilista. Considerado etilista quando há consumo regular de álcool (pelo menos uma dose por semana).
- i) Data de início da nQRT.
- j) Data da realização do hemograma pré-nQRT.
- k) Dados referentes ao hemograma pré-nQRT: hemoglobina (g/dl), hematócrito (%), leucócitos (número/mm³), neutrófilos (número/mm³), eosinófilos(número/mm³), basófilos(número/mm³), linfócitos(número/mm³), monócitos(número/mm³), plaquetas(número/mm³).
- l) Dosagem de antígeno carcinoembrionário (CEA) (ng/ml).
- m) Data do final da nQRT.
- n) Data da realização do procedimento cirúrgico.
- o) Tempo transcorrido entre o final da nQRT e a cirurgia: calculado em semanas.

3.5.2 Variáveis patológicas

Os dados referentes às características patológicas dos tumores foram obtidos através de consulta ao laudo do exame anatomopatológico de cada paciente. Nos casos com laudos incompletos, foi realizada revisão das lâminas de cada paciente para coleta das informações faltantes. Os dados coletados seguem descritos a seguir:

- a) Tamanho do tumor: medido em cm.
- b) Grau de diferenciação tumoral histológica: descrito como bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado, conforme adaptação da classificação AJCC⁽¹⁷⁰⁾.
- c) Configuração macroscópica do tumor: classificada como ulcerado, infiltrativo, exofítico, plano, estenosante, deprimido ou úlcero-infiltrativo, conforme classificação adaptada de Borrmann⁽¹⁷¹⁾.
- d) Budding tumoral: presente ou ausente conforme simplificação das recomendações de Lugli⁽¹⁷²⁾.
- e) Invasão linfática tumoral: presente ou ausente conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- f) Invasão vascular tumoral: presente ou ausente conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- g) Invasão perineural tumoral: presente ou ausente conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- h) Perfuração tumoral: presente ou ausente conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- i) Margem distal do tumor: livre ou comprometida conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- j) Margem radial do tumor: livre ou comprometida conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- k) Linfonodos dissecados: número absoluto conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.
- l) Linfonodos com infiltração tumoral: número absoluto conforme recomendações do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁾.

- m) Profundidade de invasão tumoral na parede do reto conforme classificação AJCC⁽¹⁷⁰⁾: pT0 (sem evidências de tumor), pTis (carcinoma in situ ou intramucoso), pT1 (invasão tumoral até a camada submucosa, respeitando a camada muscular própria), pT2 (invasão da camada muscular própria), pT3 (invasão tumoral até tecidos perirretais), pT4 (invasão de órgão ou estrutura adjacente).
- n) Acometimento linfonodal conforme classificação AJCC⁽¹⁷⁰⁾: simplificada em pN0 (sem linfonodos com infiltração tumoral), pN1 (presença de 1 a 3 linfonodos com infiltração tumoral) ou pN2 (presença de 4 ou mais linfonodos com infiltração tumoral).
- o) Realização de ampliação de margem na cirurgia: sim ou não.
- p) Estadio pTNM de acordo com a classificação AJCC⁽¹⁷⁰⁾: simplificada em: 1, 2, 3 e 4.

3.5.3 Classificação dos graus de resposta à terapia neoadjuvante (TRG)

A análise patológica das peças tumorais foi realizada de acordo com padronização do Colégio Americano de Patologistas⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾ e permitiu a classificação da resposta do tumor à nQRT em 4 graus descritos a seguir:

TRG 0: Sem células tumorais viáveis (resposta completa).

TRG 1: Presença de células tumorais isoladas ou presença de raros grupos de células tumorais (resposta quase completa).

TRG 2: Presença de neoplasia residual com sinais evidentes de regressão tumoral, porém com visualização de mais que algumas células ou raros pequenos grupos de células tumorais (resposta parcial).

TRG 3: Presença de neoplasia residual extensa, sem regressão tumoral evidente (sem resposta).

Esta avaliação é realizada somente no tumor primário, sem análise de metástases linfonodais.

3.5.4 Análise laboratorial dos hemogramas utilizados no estudo

Os dados dos hemogramas utilizados no presente estudo foram obtidos através de consulta ao sistema informatizado de laudos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCmed).

As amostras foram analisadas pelo aparelho da linha Sysmex® XE-5000 (Kobe, Japão), que utiliza a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente com laser semiconductor e foco hidrodinâmico. Esse aparelho é configurado para selecionar amostras que apresentem valores pré-determinados para reanálise, especificados a seguir:

- a) Leucócitos em número igual ou superior a 25.000/mm³.
- b) Hemoglobina menor ou igual a 7g/dl.
- c) Plaquetas em número menor ou igual a 80.000/mm³ e maior ou igual a 1.000.000/mm³.
- d) Linfócitos em número maior ou igual a 4.000/mm³ em adultos ou maior ou igual a 7.000/mm³ em crianças com até 10 anos de idade.
- e) Monócitos em número maior ou igual a 1.500/mm³ em adultos ou maior ou igual a 3.000/mm³ em crianças com até 10 anos de idade.
- f) Basófilos em número maior ou igual a 500/mm³.
- g) Neutrófilos em número maior ou igual a 20.000/mm³ ou menor ou igual a 1.000/mm³.

- h) Granulócitos imaturos em número maior ou igual a 3%.
- i) Volume corpuscular médio (VCM) maior ou igual a 120 fl ou menor ou igual a 70 fl.
- j) Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) menor que 30% e VCM normal ou alto.
- k) Reticulócitos em número maior ou igual a 24%.
- l) CHCM maior ou igual a 38 % associados a valores de hemoglobina elevados.
- m) CHCM maior ou igual a 38% associados a VCM acima dos limites superiores.
- n) RDW maior ou igual a 22%.

Amostras que não se enquadram nos critérios de reavaliação são laudadas digitalmente e enviadas ao Sistema HCmed. As outras amostras, por sua vez, são conduzidas a um outro equipamento (SP-10), que realiza a fixação e coloração das amostras selecionadas. Posteriormente, as lâminas resultantes são analisadas pelo módulo Sysmex CellaVision® DM1200 (Kobe, Japão), que faz a leitura e a primeira diferenciação das linhagens celulares encontradas, baseando-se em caracteres morfológicos de cada célula. Uma vez catalogadas, um examinador analisa as imagens obtidas pelo aparelho automatizado e edita a classificação das células conforme sua própria observação de cada espécime para posterior liberação do laudo final no sistema.

3.5.5 Cálculo de RNL, RPL e RLM

A razão neutrófilo-linfócito foi calculada através da divisão do número de neutrófilos pelo número de linfócitos obtidos do mesmo hemograma. Foram incluídas 2 casas decimais para o valor de RNL.

A razão plaqueta-linfócito foi calculada através da divisão do número de plaquetas pelo número de linfócitos obtidos no mesmo hemograma. Foram incluídas 2 casas decimais para RPL.

A razão linfócito-monócito foi calculada através da divisão do número de linfócitos pelo número de monócitos obtidos do mesmo hemograma. Foram incluídas 2 casas decimais para o valor de RLM.

3.5.6 Análise estatística

O processo de análise de dados da presente pesquisa iniciou-se com uma exploração descritiva, incluindo frequência absoluta dos atributos qualitativos com valores de média, desvio padrão (DP), mediana, percentil 25 (P25) e 75 (P75); mínimos e máximos também foram calculados. As tabelas descritivas das variáveis qualitativas incluíram o intervalo de confiança de 95% (IC95%) e as quantitativas incluíram as medidas de tendência central e dispersão.

Para estudar a distribuição das variáveis qualitativas de acordo com o grupo, foi empregado o teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer quando necessário. O teste de Mann-Whitney foi usado para a comparação de dois grupos independentes no caso de variáveis quantitativas e, para a comparação de mais de 2 grupos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, ambas técnicas de estatística não paramétricas.

A avaliação diagnóstica das razões RNL, RPL e RLM foi realizada por meio da curva ROC que, no plano unitário, resulta da representação gráfica dos índices de precisão 1-especificidade versus sensibilidade, oriundas da variação do ponto de corte. Em geral, uma AUC de 0,5 sugere ausência de discriminação (isto é, capacidade de diagnosticar pacientes com e sem doença ou condição baseada no teste), 0,5 a 0,7 é considerada baixa,

0,7 a 0,8 é considerada intermediária, 0,8 a 0,9 é considerada alta, e mais de 0,9 é considerada muito alta⁽¹⁷⁶⁾.

A estratégia para escolha do ponto de corte foi realizada com base no cálculo do índice de Youden; os de sensibilidade e especificidade foram estimados para cada um dos pontos.

Um modelo linear generalizado, utilizando distribuição de Poisson com função de ligação identidade, foi utilizado para estimar o risco relativo, intervalo de confiança e valores de *p* ajustados segundo potenciais fatores de confusão e outros fatores associados à resposta completa. O método de seleção de variáveis utilizado foi o método *enter*.

Uma curva ROC foi proposta para avaliar a qualidade das estimativas de risco projetada para a ausência de resposta completa.

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0,05 e intervalo de confiança (IC) de 95% e foram realizados com apoio computacional dos softwares IBM SPSS 26 - *Statistical Package for the Social Sciences* (IBM Corporation, Armonk, NY, Estados Unidos da América) e Excel 2010® - Microsoft Office (*Microsoft Corporation*, Redmond, WA, Estados Unidos da América).

4 Resultados

4.1 Descrição geral da amostra – variáveis clínicas e laboratoriais

Foram incluídos 509 pacientes submetidos a tratamento multimodal de neoplasia de reto no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP-HCFMUSP) entre 06/06/2011 e 04/01/2016.

O processo de seleção dos indivíduos para o presente estudo está descrito na Figura 2.

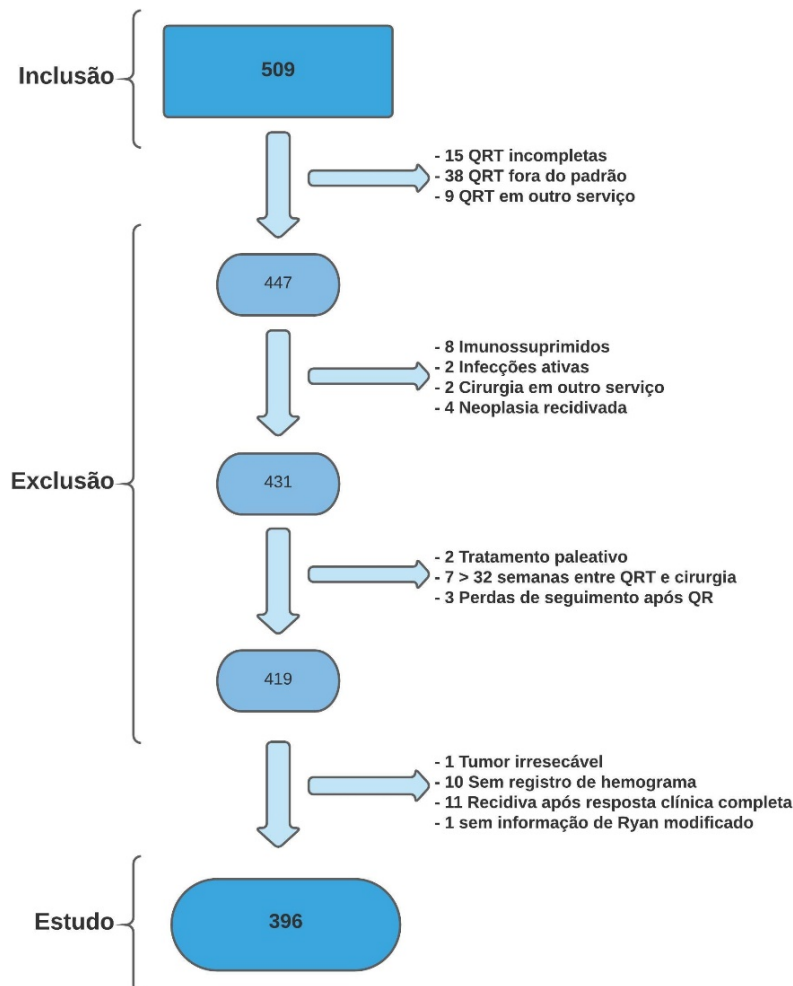


Figura 2 - Fluxograma apresentando indivíduos incluídos, motivos de exclusão e amostra final do estudo.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Foram avaliados 396 pacientes; deste total, 379 (95,7%) foram operados, e o tempo médio entre o final da nQRT e a cirurgia foi de 15(\pm 3,7) semanas.

Houve predominância de pacientes do sexo masculino, com 216 pacientes (54,5%), com média de idade de 60,5 anos (\pm 12,2 anos). A mediana de comorbidades foi 1, variando de 0 a 5.

Cinquenta e oito pacientes (14,9%) referiram tabagismo ativo, com carga calculada de tabaco média de 31(\pm 24,2) maços-ano. Quanto ao etilismo, 77 (20,5%) dos pacientes relataram etilismo ativo.

A classe de medicação de uso contínuo mais frequente foi a dos anti-hipertensivos, utilizada por 166 pacientes (41,9%).

Os dados das características clínicas dos pacientes estão detalhados nas Tabelas 1.1 e 1.2.

Tabela 1.1 - Características clínicas da população estudada (variáveis quantitativas); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	N	Ausentes	Média(\pm DP)	Mediana (IIQ)	Min-Max
Tabagista Quanto? (maços-ano) *	183	213	31,0 (\pm 24,2)	27,0 (13,8-42,5)	0,2-150,0
Idade (anos) *	396	0	60,5 (\pm 12,2)	62,0 (53,8-68,0)	20,0-87,0
Número comorbidades*	396	0	1,2 (\pm 1,3)	1,0 (0,0-2,0)	0,0-5,0
Tempo entre fim nQRT e cirurgia (semanas) *	379	17	15,0 (\pm 3,7)	13,7 (13,0-16,0)	8,6-32,6

* Características quantitativas: média (\pm desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) e nível descritivo. Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Tabela 1.2 - Características clínicas da população estudada (variáveis qualitativas); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável*	N	% (IC95%)	
Sexo			
Masculino	216	54,5 (49,5-59,6)	
Feminino	180	45,5 (40,4-50,5)	
Foi submetido a tratamento cirúrgico ?			
Sim	379	95,7 (93,9-97,6)	
Não	17	95,7 (93,9-97,6)	
Etilista ?			
Sim	77	20,5 (15,4-25,6)	
Não	222	59,0 (54,0-64,2)	
Ex-etilista	77	20,5 (15,4-25,6)	
Tabagista ?			
Sim	58	14,9 (9,8-20,4)	
Não	164	42,3 (37,1-47,7)	
Ex-tabagista	166	42,8 (37,6-48,3)	
Medicamentos	Anti-hipertensivo		
	Sim	166	41,9 (37,1-47,1)
	Não	230	58,1 (53,3-63,3)
	Hipoglicemiante		
	Sim	60	15,2 (11,9-18,7)
	Não	336	84,8 (81,6-88,4)
	Analgésico		
	Sim	71	17,9 (14,4-21,8)
	Não	325	82,1 (78,5-85,9)
	AINH		
	Sim	12	3,0 (1,8-4,8)
	Não	384	97,0 (95,7-98,7)
	Broncodilatador		
	Sim	7	1,8 (0,8-3,0)
	Não	389	98,2 (97,2-99,5)
	IBP/antiácido		
	Sim	41	10,4 (7,6-13,3)
	Não	355	89,6 (86,9-92,5)
	Opioide		
	Sim	39	9,8 (7,3-12,9)
	Não	357	90,2 (87,6-93,2)
	Vitaminas		
	Sim	29	7,3 (5,1-9,8)
	Não	367	92,7 (90,4-95,2)
	Estatina		
	Sim	47	11,9 (9,1-15,1)
	Não	349	88,1 (85,4-91,4)
	Antiagregante plaquetário/anticoagulante		
Sim	40	10,1 (7,3-12,9)	
Não	356	89,9 (87,1-92,7)	
Antidepressivo			
Sim	19	4,8 (3,0-6,9)	
Não	377	95,2 (93,4-97,3)	
Outros			
Sim	109	27,5 (23,2-32,1)	
Não	287	72,5 (68,2-77,0)	

* Características qualitativas: frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95% (IC95%).

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Quanto às características laboratoriais, o número médio de leucócitos foi 7.940,7(\pm 2305,2), de neutrófilos foi 4.940,5(\pm 1860), de linfócitos foi 2.007,2(\pm 658,1), de monócitos foi 678,5(\pm 258,7) e de plaquetas foi 292.318,2(\pm 93.452,5).

O CEA médio foi 15,7(\pm 32,7), o RNL foi 2,7(\pm 1,5), o RPL foi 163(\pm 86,8) e o RLM foi 3,2(\pm 1,3).

Os dados laboratoriais dos pacientes estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 - Características laboratoriais da população estudada*; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	N	Ausentes	Média (\pm DP)	Mediana (IIQ)	Min-Max
Hb (g/dL)	396	0	12,7 (\pm 2,1)	13,0 (11,6-14,1)	5,8-17,3
Ht (%)	396	0	38,6 (\pm 5,2)	39,2 (35,8-42,3)	20,8-50,6
Leucócitos **	396	0	7.940,7 (\pm 2.305,2)	7.720,0 (6.417,5 – 9.135,0)	2.970,0-18.650,0
Neutrófilos **	396	0	4.940,5 (\pm 1.860,0)	4.623,7 (3.767,8-5.793,4)	1.539,7-14.228,9
Eosinófilos **	396	0	278,2 (\pm 259,0)	208,1 (116,5-345,5)	0,0-1.938,8
Basófilos **	396	0	36,3 (\pm 22,9)	31,5 (20,4-47,4)	0,0-176,8
Linfócitos **	396	0	2.007,2 (\pm 658,1)	1.915,1 (1.525,9-2.364,4)	352,8-5.030,2
Monócitos **	396	0	678,5 (\pm 258,7)	637,1 (510,3-794,5)	150,3-1.903,6
Plaquetas **	396	0	292.318,2 (\pm 93.452,5)	280.000,0 (228.750,0-329.500,0)	102.000,0-741.000,0
RNL	396	0	2,7 (\pm 1,5)	2,4 (1,8-3,2)	0,7-14,1
RPL	396	0	163,0 (\pm 86,8)	140,7 (112,0-191,9)	56,2-635,0
RLM	396	0	3,2 (\pm 1,3)	3,1 (2,3-4,0)	0,8-10,2
CEA (ng/ml)	383	13	15,7 (\pm 32,7)	4,9 (2,6-13,1)	0,4-263,6

* Características quantitativas: média (\pm desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) e nível descritivo.

** Número/mm³.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

4.2 Descrição geral da amostra – variáveis anatomopatológicas

Em relação aos achados anatomopatológicos, houve predominância de tumores ypT3, com 168 casos (44,4%) e ypN 0 com 261 casos (68,9%); os estádios mais frequentes foram o 3 e o 2, com 113 casos (28,6%) e 101 casos (25,6%) respectivamente (Tabela 3).

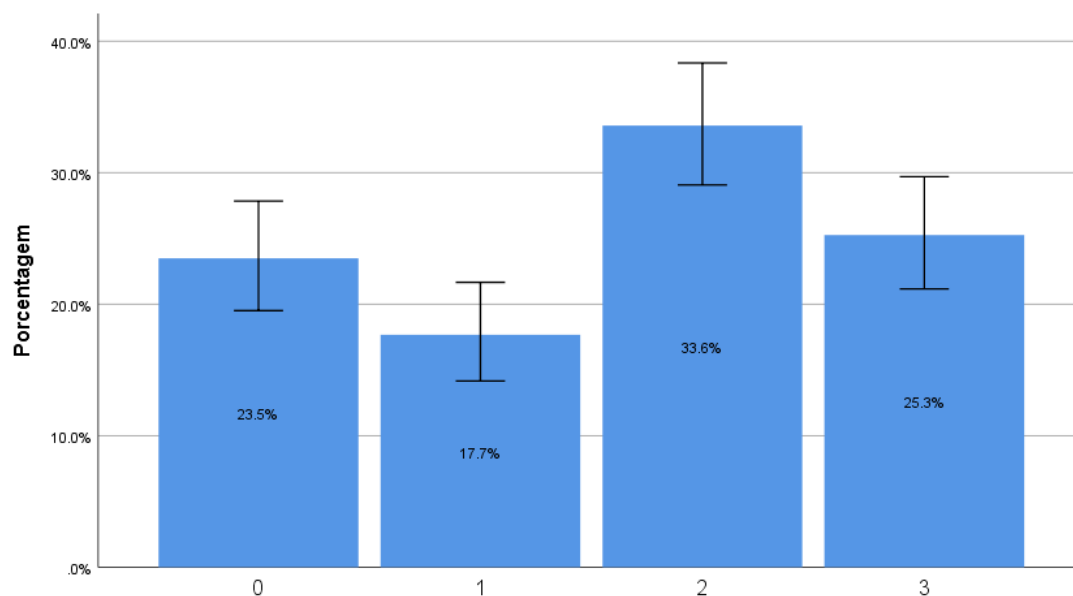
Tabela 3 - Características anatomopatológicas da população estudada*; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável		n	% (IC95%)
ypT*	0	76	20,1 (15,1-25,6)
	1	22	5,8 (0,8-11,3)
	2	87	23,0 (18,0-28,5)
	3	168	44,4 (39,4-49,9)
	4	25	6,6 (1,6-12,1)
ypN*	0	261	68,9 (64,4-73,7)
	1	86	22,7 (18,2-27,5)
	2	32	8,4 (4,0-13,2)
Estádio*	0	87	22,0 (17,0-27,4)
	1	87	22,0 (17,0-27,4)
	2	101	25,6 (20,5-30,9)
	3	113	28,6 (23,5-34,0)
	4	7	1,8 (0,0-7,1)

* Características qualitativas: frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95%(IC95%).
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Entre os indivíduos avaliados, 93 (23,5%; IC95% 19,5%-27,8%) foram classificados como TRG 0; 70 (17,7%; IC95%: 14,2%-21,7%) como TRG 1; 133 (33,6%; IC95%: 29,1%-38,3%) como TRG 2 e 100 (25,3%; IC95%: 21,2%-29,7%) como TRG 3 (Gráfico 1). As categorias do escore TRG foram consideradas para estratificar o estudo das demais variáveis.

Gráfico 1 - Distribuição do escore de TRG entre os indivíduos avaliados



Fonte: ICESP-HCFMUSP - 06/06/2011 a 04/01/2016.

Os demais dados das características anatomopatológicas dos pacientes estão detalhados nas tabelas dos anexos C e D.

Na análise e estratificação dos graus de resposta tumoral foram observados diferentes aspectos morfológicos nos casos de resposta tumoral completa (TRG 0), conforme exemplificado nas Figuras 3, 4a e 4b.

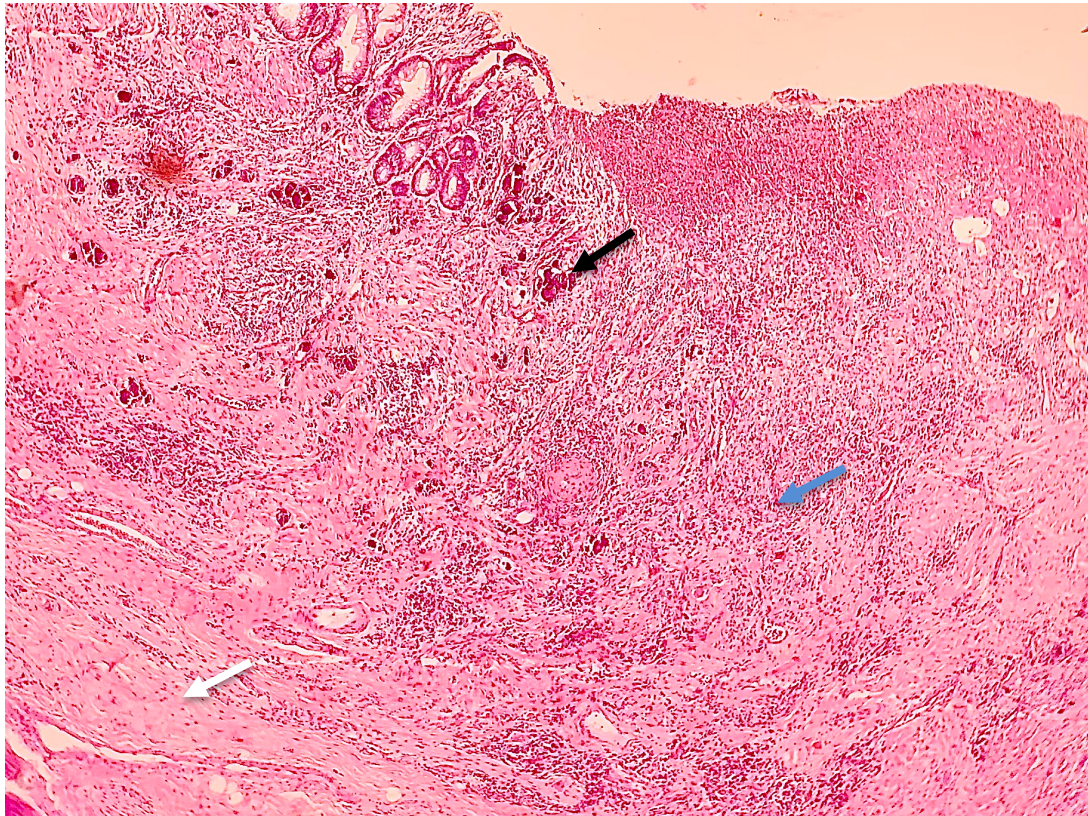


Figura 3 - (HE 40x) Resposta tumoral completa (TRG 0) evidenciando-se fibrose (seta branca), inflamação (seta azul) e calcificação distrófica (seta preta).
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

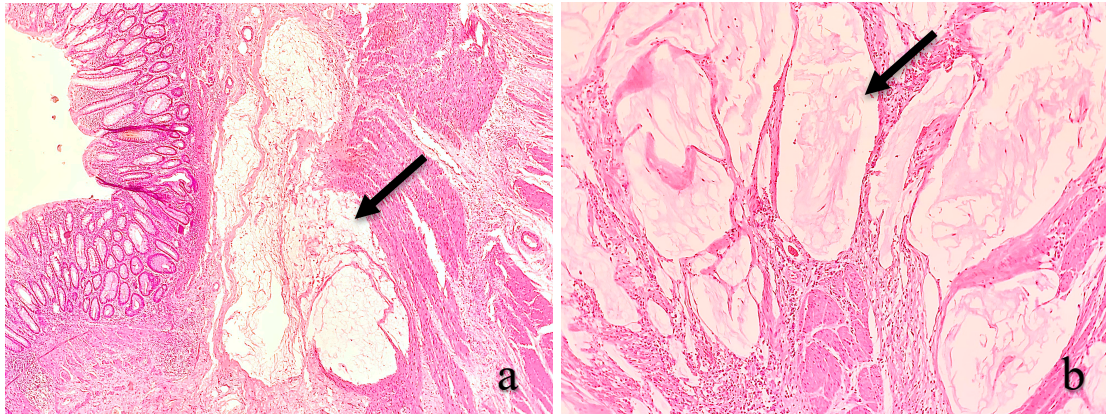


Figura 4 - (HE 40x) Resposta tumoral completa (TRG 0) evidenciando-se lagos de mucina acelulares superficiais (a) e lagos de mucina acelulares nas camadas mais profundas (b) - setas pretas.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

A resposta quase completa (TRG 1) é exemplificada na Figura 5.

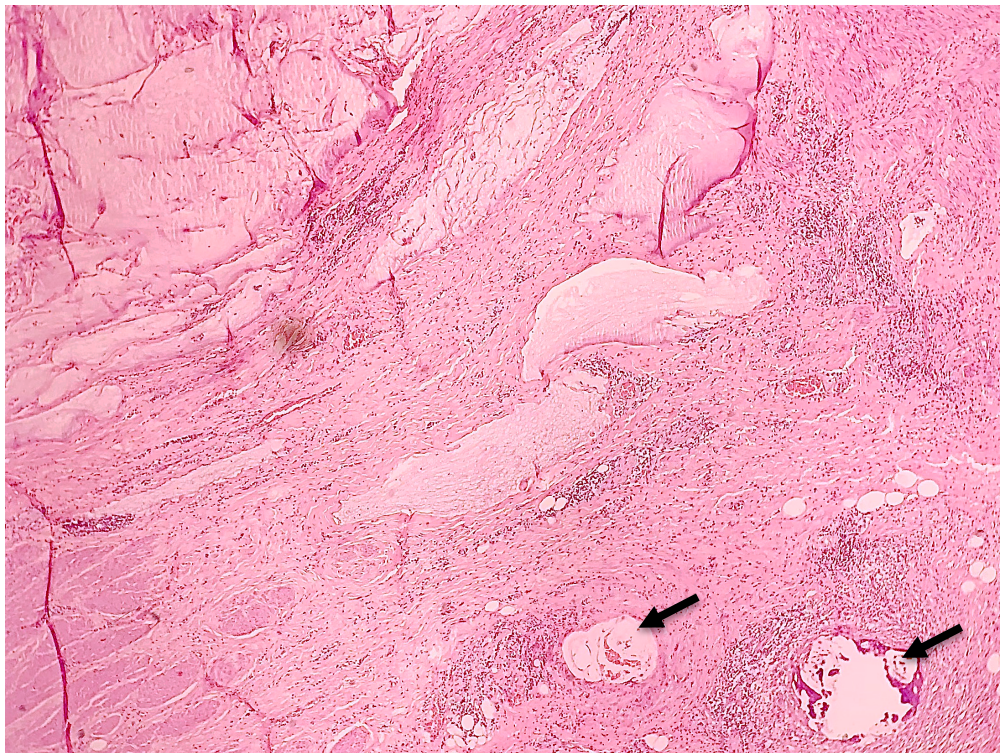


Figura 5 - (HE 40x) Resposta tumoral quase completa (TRG 1) evidenciando-se extensos lagos de mucina com pequenos grupos de células neoplásicas residuais (setas pretas).

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

As respostas parciais (TRG 2) e ausência de resposta (TRG 3) estão representadas nas Figuras 6, 7a e 7b.

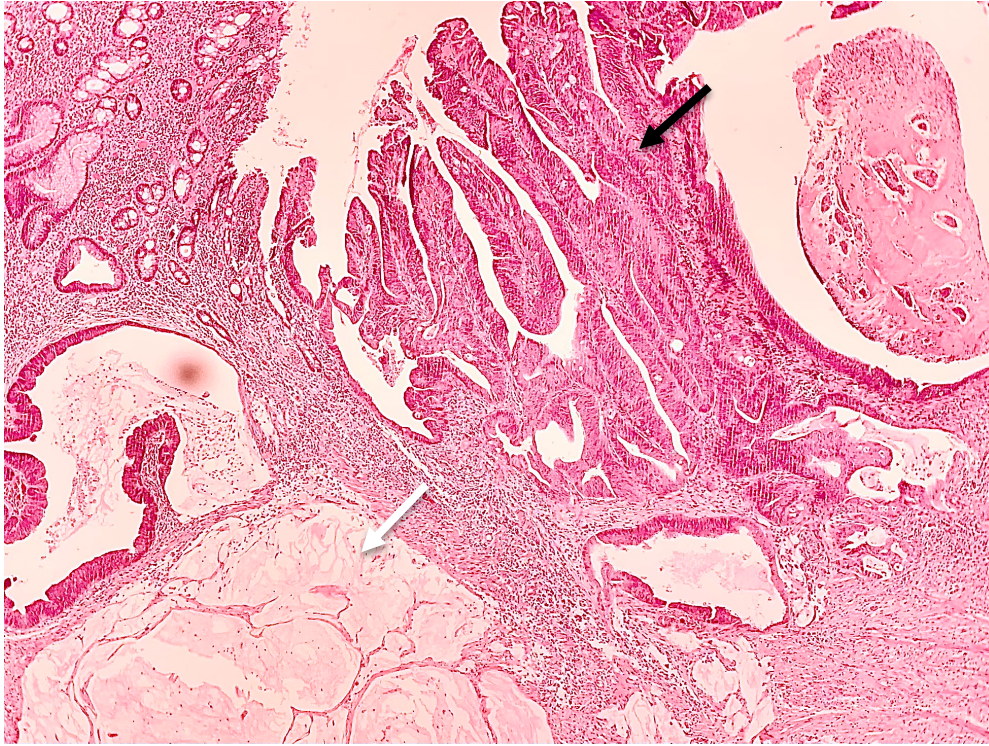


Figura 6 - (HE 40x) Resposta tumoral parcial (TRG 2), evidenciando-se lesão residual (seta preta) com alguma evidência de regressão tumoral (lagos de mucina – seta branca).
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

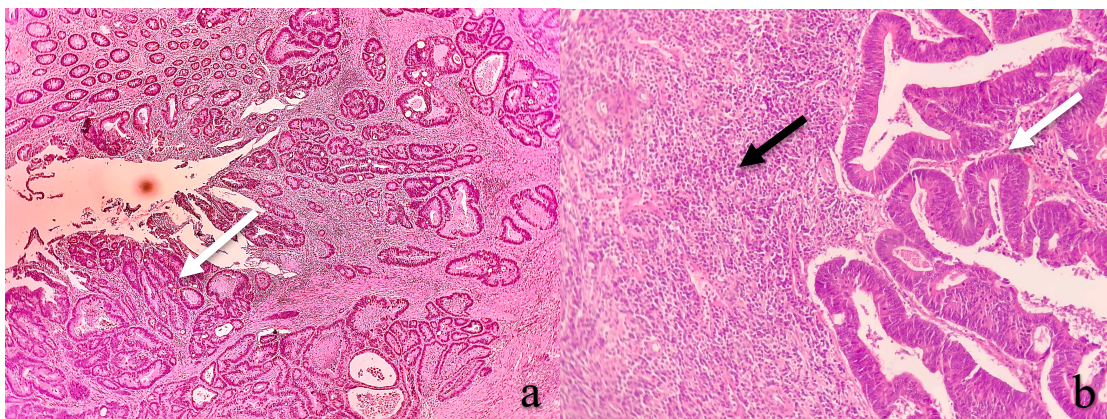


Figura 7 - (HE 40x) Ausência de resposta (TRG 3), evidenciando-se extensa neoplasia residual - seta branca (a), e neoplasia residual (seta branca), com intenso infiltrado inflamatório (seta preta) (b).
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

4.3 Fatores associados aos graus de resposta à nQRT (TRG)

A análise dos fatores associados aos graus de resposta (TRG) à nQRT iniciou-se com a sua estratificação em 4 categorias (0, 1, 2 e 3).

Verificou-se maior percentual de homens entre os pacientes que tiveram piores respostas à nQRT, observando-se TRG 2 e 3 em 82 (61,7%) e 63 (63,0%) indivíduos, e TRG 0 e 1 em 41 (44,1%) e 30 (42,9%) indivíduos. Também foi observada associação entre uso de medicação anti-hipertensiva e os estratos TRG ($p=0,004$). Não se observou associação entre os estratos de TRG e as variáveis etilismo e tabagismo (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Características clínicas qualitativas estratificadas de acordo com a classificação TRG, incluindo frequência absoluta, relativa e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	TRG				p-valor*	
	0	1	2	3		
Sexo masculino	41 (44,1%)	30 (42,9%)	82 (61,7%)	63 (63,0%)	0,004	
Tabagista	7 (7,8%)	9 (13,2%)	26 (19,8%)	16 (16,2%)	0,141	
Ex-tabagista	38 (42,2%)	29 (42,6%)	60 (45,8%)	39 (39,4%)		
Etilista	12 (14,1%)	11 (16,4%)	28 (22,0%)	26 (26,8%)	0,156	
Ex-etilista	15 (17,6%)	11 (16,4%)	28 (22,0%)	23 (23,7%)		
Medicamentos	Anti-hipertensivo	50 (53,8%)	24 (34,3%)	49 (36,8%)	43 (43%)	0,037
	Hipoglicemiante	16 (17,2%)	11 (15,7%)	20 (15%)	13 (13%)	0,877
	Analgésico	11 (11,8%)	14 (20%)	25 (18,8%)	21 (21%)	0,352
	AINH	2 (2,2%)	4 (5,7%)	1 (0,8%)	5 (5%)	0,131
	Broncodilatador	2 (2,2%)	1 (1,4%)	3 (2,3%)	1 (1%)	0,886
	IBP / antiácido	10 (10,8%)	11 (15,7%)	15 (11,3%)	5 (5%)	0,145
	Opióide	6 (6,5%)	6 (8,6%)	13 (9,8%)	14 (14%)	0,351
	Vitamina	5 (5,4%)	4 (5,7%)	13 (9,8%)	7 (7%)	0,577
	Estatina	16 (17,2%)	9 (12,9%)	15 (11,3%)	7 (7%)	0,179
	Antiagregante plaquetario/ anticoagulante	15 (16,1%)	5 (7,1%)	11 (8,3%)	9 (9%)	0,170
	Antidepressivo	5 (5,4%)	3 (4,3%)	6 (4,5%)	5 (5%)	0,986
	Outros	29 (31,2%)	16 (22,9%)	35 (26,3%)	29 (29%)	0,661

*p-valor baseado no teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Fonte: ICESP-HCFMUSP

Entre os pacientes estudados com TRG 0, 17 (18,3%) tiveram resposta clínica completa e foram incluídos em grupo de observação “*watch and wait*”, não sendo submetidos a procedimento cirúrgico.

Verificou-se que 11 variáveis quantitativas apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os estratos de TRG: Ht, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, plaquetas, RNL, RPL, RLM, CEA, tamanho do tumor e número de LN comprometidos (Tabela 4.2).

Também foi possível verificar, por meio das medidas de tendência central, que as variáveis: leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, RNL, RPL, tamanho do tumor e número de LN comprometidos apresentaram ainda aumento concomitante à elevação dos estratos de TRG (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 - Características quantitativas estratificadas de acordo com a classificação TRG, incluindo média (\pm desvio padrão) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	TRG 0	TRG 1	TRG 2	TRG 3	p-valor*
	Média(\pm DP)	Média(\pm DP)	Média(\pm DP)	Média(\pm DP)	
Idade(anos)	61,2 (\pm 12,4)	58,1 (\pm 12,4)	60,8 (\pm 12,5)	61,0 (\pm 11,6)	0,462
Número comorbidades	1,5 (\pm 1,3)	1,2 (\pm 1,3)	1,1 (\pm 1,2)	1,1 (\pm 1,2)	0,176
Tabagista(maços-ano)	26,9 (\pm 21,3)	36,0 (\pm 30,9)	29,7 (\pm 22,1)	32,1 (\pm 23,8)	0,750
Hb (g/dL)	13,1 (\pm 1,8)	13,2 (\pm 1,9)	12,3 (\pm 2,2)	12,4 (\pm 2,1)	0,605
Ht (%)	39,7 (\pm 4,6)	39,8 (\pm 4,7)	37,7 (\pm 5,4)	38,0 (\pm 5,6)	0,002
Leucócitos **	7.460 (\pm 1.840)	7.660 (\pm 2.120)	7.910(\pm 2.230)	8.617 (\pm 2.733)	0,006
Neutrófilos **	4.470 (\pm 1.370)	4.750 (\pm 1.710)	4.910(\pm 1.780)	5.549 (\pm 2.260)	0,015
Eosinófilos **	227,9 (\pm 195,7)	250,3 (\pm 203,4)	301,9(\pm 289,9)	312,9 (\pm 293,9)	0,002
Basófilos **	35,0 (\pm 20,5)	31,9 (\pm 19,7)	39,0 (\pm 25,9)	36,9 (\pm 22,5)	0,114
Linfócitos **	2.090 (\pm 600)	2.000 (\pm 680)	1.970 (\pm 600)	1.960 (\pm 740)	0,174
Monócitos **	630,6 (\pm 231,2)	619,9 (\pm 185,7)	687,3(\pm 257,3)	752,5 (\pm 308,0)	0,335
Plaquetas ***	275 (\pm 81)	270 (\pm 73)	301 (\pm 103)	310 (\pm 97)	0,006
RNL	2,3 (\pm 1,0)	2,6 (\pm 1,4)	2,7 (\pm 1,2)	3,2 (\pm 2,0)	0,008
RPL	145,1 (\pm 77,9)	152,2 (\pm 83,9)	168,4 (\pm 88,6)	180,1 (\pm 91,4)	<0,001
RLM	3,7 (\pm 1,4)	3,4 (\pm 1,2)	3,2 (\pm 1,3)	2,9 (\pm 1,3)	<0,001
CEA (ng/ml)	8,2 (\pm 17,8)	11,8 (\pm 24,5)	21,0 (\pm 38,6)	18,6 (\pm 38,2)	<0,001
Tamanho do tumor (cm)	0,6 (\pm 1,7)	1,8 (\pm 1,4)	3,3 (\pm 1,7)	4,0 (\pm 2,1)	<0,001
Número LN comprometidos	0,2 (\pm 0,7)	0,8 (\pm 1,8)	0,9 (\pm 1,7)	1,3 (\pm 3,6)	<0,001
Número LN ressecados	20,1 (\pm 10,5)	22,8 (\pm 13,9)	23,4 (\pm 14,1)	23,4 (\pm 15,3)	0,516

*valor de p baseado no teste de Kruskal-Wallis; ** Número/mm³; *** Número x1000/mm³.
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Na análise dos diferentes graus de resposta à nQRT, há interesse específico em estudar os indivíduos que apresentaram resposta completa, para isso os pacientes foram divididos em 2 grupos: resposta completa (TRG 0) e resposta incompleta (TRG 1-2-3).

4.4 Fatores associados à resposta completa à nQRT (TRG 0 vs 1-2-3)

Através desta análise, verificou-se potencial diagnóstico dos marcadores inflamatórios, observando-se que RNL e RPL apresentaram maiores médias entre os pacientes com resposta incompleta (TRG 1-2-3), enquanto RLM apresentou maior média entre os pacientes com resposta completa (TRG 0) conforme mostrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Marcadores inflamatórios no sangue periférico estratificados de acordo com resposta completa à nQRT (TRG 0) e incompleta (TRG 1-2-3), incluindo média (\pm desvio padrão) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

	TRG 0	TRG 1-2-3	p-valor*
Variável	Média(\pm DP)	Média(\pm DP)	
RNL	2,3 (\pm 1,0)	2,9 (\pm 1,6)	<0,001
RPL	145,1 (\pm 77,9)	168,5 (\pm 88,8)	0,002
RLM	3,7 (\pm 1,4)	3,1 (\pm 1,3)	<0,001

*Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney.
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

A análise das demais variáveis quantitativas neste contexto, apontou que o número de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos e monócitos, além dos valores de CEA, do tamanho do tumor e do número de linfonodos comprometidos apresentaram maiores médias entre os pacientes com resposta incompleta; enquanto o número de comorbidades e os valores de Hb e de Ht foram significativamente maiores no grupo de pacientes com resposta completa, conforme mostrado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Demais características quantitativas estratificadas de acordo com resposta completa à nQRT (TRG 0) e incompleta (TRG 1-2-3), incluindo média (\pm desvio padrão) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	TRG 0 Média(\pm DP)	TRG 1-2-3 Média(\pm DP)	p-valor*
Idade(anos)	61,2 (\pm 12,4)	60,2(\pm 12,2)	0,505
Número comorbidades	1,5 (\pm 1,3)	1,1(\pm 1,2)	0,001
Tabagista(maços-ano)	26,9 (\pm 21,3)	31,7 (\pm 24,7)	0,320
Hb (g/dL)	13,1 (\pm 1,8)	12,6 (\pm 2,1)	0,049
Ht (%)	39,7 (\pm 4,6)	38,3 (\pm 5,4)	0,043
Leucócitos **	7.460,4 (\pm 1.849,6)	8.088,1 (\pm 2.411,5)	0,045
Neutrófilos **	4.470,7 (\pm 1.372,2)	5.084,7 (\pm 1.965,3)	0,011
Eosinófilos **	227,9 (\pm 195,7)	293,6 (\pm 274,0)	0,032
Basófilos **	35,0 (\pm 20,5)	36,7 (\pm 23,6)	0,839
Linfócitos **	2.096,3 (\pm 609,5)	1.979,8 (\pm 670,9)	0,094
Monócitos **	630,6 (\pm 231,2)	693,3 (\pm 265,2)	0,049
Plaquetas **	275.408,6 (\pm 81.252,1)	297.508,3 (\pm 96.418,5)	0,070
CEA (ng/ml)	8,2 (\pm 17,8)	18,1 (\pm 35,8)	<0,001
Tamanho do tumor(cm)	0,6 (\pm 1,7)	3,2 (\pm 1,9)	<0,001
Número linfonodos comprometidos	0,2 (\pm 0,7)	1,0 (\pm 2,5)	<0,001
Número linfonodos ressecados	20,1 (\pm 10,5)	23,2 (\pm 14,4)	0,143

*Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney.

** Número/mm³.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Na análise das variáveis qualitativas, observou-se maior predominância de pacientes do sexo masculino entre os pacientes com ausência de resposta completa. Por outro lado, observou-se maior percentual de pacientes em uso de medicação anti-hipertensiva e antiagregante plaquetário/anticoagulante entre os pacientes com resposta completa (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Características clínicas qualitativas estratificadas de acordo com resposta completa à nQRT (TRG 0) e incompleta (TRG 1-2-3), incluindo frequência absoluta, relativa, intervalo de confiança de 95%(IC95%) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	TRG 0		TRG 1-2-3		p-valor*	
	n	%(IC95%)	n	%(IC95%)		
Masculino	41	44,1%(34,4%-54,7%)	175	57,8%(52,1%-63,6%)	0,021	
Tabagista	7	7,8% (0,0%-18,9%)	51	17,1% (11,1%-23,2%)	0,464	
Ex-tabagista	38	42,2% (32,2%-53,4%)	128	43,0% (36,9%-49,1%)		
Etilista	12	14,1% (4,7%-23,7%)	65	22,3% (16,5%-28,2%)	0,564	
Ex-etilista	15	17,6% (8,2%-27,2%)	62	21,3% (15,5%-27,2%)		
Medicamentos	Anti-hipertensivo	50	53,8% (44,1%-64,5%)	116	38,3% (33,0%-44,2%)	0,012
	Hipoglicemiante	16	17,2% (10,8%-25,1%)	44	14,5% (10,9%-18,5%)	0,641
	Analgésico	11	11,8% (6,5%-18,4%)	60	19,8% (15,5%-24,3%)	0,110
	AINH	2	2,2% (0,0%-4,4%)	10	3,3% (1,7%-5,2%)	0,826
	Broncodilatador	2	2,2% (0,0%-4,4%)	5	1,7% (0,7%-3,1%)	1,000
	IBP / antiácido	10	10,8% (5,4%-16,7%)	31	10,2% (7,3%-13,7%)	1,000
	Opióide	6	6,5% (3,2%-11,8%)	33	10,9% (7,9%-14,5%)	0,290
	Vitaminas	5	5,4% (2,2%-10,0%)	24	7,9% (5,3%-10,9%)	0,551
	Estatina	16	17,2% (10,8%-25,1%)	31	10,2% (7,3%-13,7%)	0,102
	Antiagregante plaquetário/ anticoagulante	15	16,1% (9,7%-23,6%)	25	8,3% (5,6%-11,4%)	0,045
	Antidepressivo	5	5,4% (2,2%-10,0%)	14	4,6% (2,6%-6,9%)	0,983
	Outros	29	31,2% (22,6%-41,1%)	80	26,4% (21,8%-31,7%)	0,441

*Valor de p baseado no teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Considerando-se que há pacientes com boa resposta à nQRT que não atingem resposta completa (TRG 0), e sim resposta quase completa (TRG 1), houve interesse em estudar potencial diagnóstico dos marcadores tumorais entre os pacientes com resposta boa e resposta ruim.

Realizaram-se, então, comparações múltiplas para as associações observadas na estratificação de TRG em 4 categorias (Tabelas 4.1 e 4.2), através das quais foi possível observar que RNL, RPL e RLM apresentaram diferenças significantes entre os estratos TRG 0 e 2, 0 e 3 e 1 e 3 (tabela do anexo E), achados que embasaram a estratificação dos pacientes em “resposta boa” (TRG 0-1) e “resposta ruim” (TRG 2-3), descrita a seguir.

4.5 Fatores associados à estratificação entre “resposta boa” (TRG 0-1) e “resposta ruim” (TRG 2-3)

Na análise realizada após divisão dos pacientes entre “resposta boa” e “resposta ruim” (TRG 0-1 *versus* TRG 2-3), os resultados foram similares aos observados na análise dos pacientes com resposta completa *versus* resposta incompleta (TRG 0 *versus* TRG 1-2-3): observou-se maior prevalência de homens no grupo “resposta ruim” - TRG 2-3 (tabela do anexo F). O número de leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, RNL, RPL, CEA, tamanho do tumor e número de linfonodos comprometidos apresentaram medidas de tendência central significativamente mais elevadas entre pacientes com “resposta ruim” - TRG 2-3 ($p < 0,05$), ao passo que Hb, Ht e RLM foram significativamente maiores no grupo “resposta boa” - TRG 0-1 (tabela do anexo G).

Duas variáveis comportaram-se de forma diferente da análise anterior: número de plaquetas e número de comorbidades. O número de plaquetas foi significativamente maior no grupo “resposta ruim” (TRG 2-3), e o número de comorbidades não foi diferente entre os 2 grupos (tabela do anexo G).

Após confirmada a relação entre os marcadores RNL, RPL e RLM e os graus de resposta à nQRT (TRG), surgiu a indagação sobre o potencial preditor de resposta

completa destes marcadores, de forma a colaborar na estratégia de condução dos pacientes, descrita a seguir.

4.6 Análise do potencial preditor de resposta à nQRT dos marcadores RNL, RPL e RLM

Os indicadores RNL, RPL e RLM foram avaliados em relação ao potencial preditivo de resposta completa (TRG 0) ou ao seu complemento (TRG 1-2-3).

Os três indicadores apresentaram acurácias comparáveis e estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Na Tabela 6 é possível verificar os valores das áreas sob a curva (AUC) incluindo os respectivos IC95%, valores de p, sensibilidade e especificidade para o melhor ponto de corte observado.

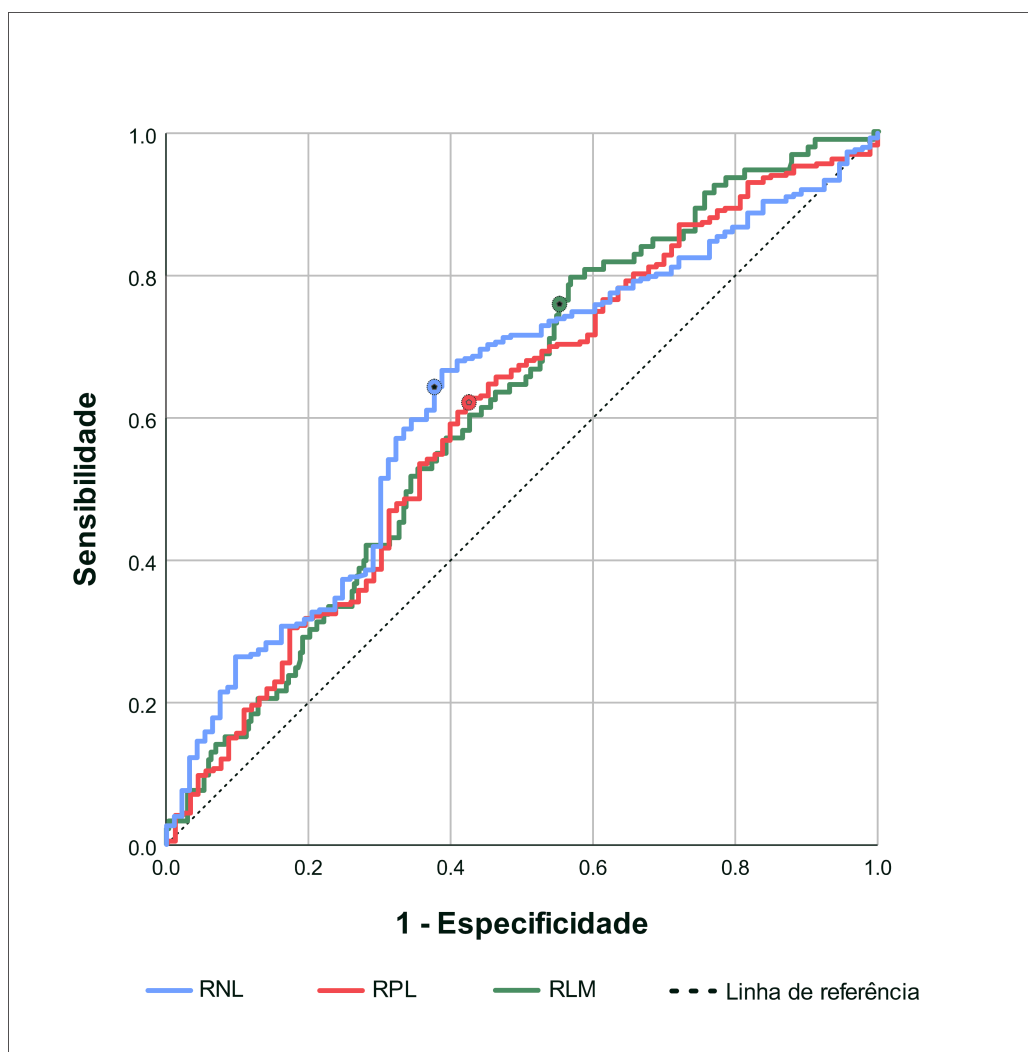
Tabela 6 - Área sob a curva para RNL, RPL e RLM; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

	RNL	RPL	RLM
Estado	TRG 1/2/3	TRG 1/2/3	TRG 0
AUC	0,627	0,606	0,615
IC95%	0,564-0,691	0,539-0,672	0,553-0,667
p-valor	<0,001	0,002	0,001
Sensibilidade	0,667	0,620	0,793
Especificidade	0,613	0,582	0,432
Ponto de corte*	2,08	129,36	2,67

* Ponto de corte foi baseado no índice de Youden.
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

O Gráfico 2 mostra as curvas ROC dos diferentes indicadores consecutivamente. Em cada linha existe um círculo que representa o melhor ponto de corte disponível. O RNL no ponto de 2,08 apresentou uma sensibilidade de 66,7% e especificidade de 61,3%, o RPL em um ponto de 129,36 apresentou sensibilidade de 62% e especificidade de 58,2% e RLM no ponto de 2,67 apresentou sensibilidade de 79,3% e especificidade de 43,2%.

Gráfico 2 - Área sob a curva para RNL , RPL e RLM



Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Utilizando-se os pontos de corte supracitados, uma análise bivariada foi realizada para avaliar a associação entre as diferentes razões e a resposta completa.

A RNL maior que 2,08 mostrou um risco relativo de 2,30 (IC95%: 1,60-3,31) para estimar TRG 1-2-3; a RPL maior que 129,36 mostrou risco relativo de 1,79 (IC95%: 1,25-2,05) e a RLM maior que 2,67 mostrou risco relativo de 0,42 (IC95%: 0,26-0,66). (Tabela 7).

Tabela 7- Estimativas de risco relativo bruto para resposta incompleta à nQRT (TRG 1-2-3) de RNL, RPL e RLM, incluindo intervalo de confiança de 95% e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

	TRG 0	%	TRG 1 + 2 + 3	%	Total	Risco Relativo		p-valor
						Estimativa	IC95%	
RNL								
≤2,08	56	35,7%	101	64,3%	157	Referência	Referência	<0,001
>2,08	37	15,5%	202	84,5%	239	2,30	1,60-3,31	
RPL								
≤129,36	53	31,5%	115	68,5%	168	Referência	Referência	0,002
>129,36	40	17,5%	188	82,5%	228	1,79	1,25-2,05	
RLM								
≤2,67	19	12,6%	131	87,4%	150	Referência	Referência	<0,001
>2,67	74	30,1%	172	69,9%	246	0,42	0,26-0,66	

*Valor de p baseado no teste exato de Fischer.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

4.7 Modelo ajustado para avaliação de RNL , RPL e RLM na predição de resposta patológica completa

Uma vez estabelecido o potencial preditor de resposta ou ausência de resposta à nQRT de RNL, RPL e RLM, restavam dúvidas sobre a possível interação de fatores de confusão que pudessem interferir neste resultado.

Optou-se, então, pela construção de um modelo generalizado múltiplo na tentativa de avaliar estes marcadores inflamatórios independentemente de potenciais fatores de confusão.

Através deste modelo, foi constatado que **RNL maior que 2,08** associou-se à ausência de resposta completa (**RR=1,19 [IC95%: 1,07 - 1,28], p=0,001**) independentemente de sexo, hábito de consumo de álcool ou uso de AINH (Tabela 8).

Tabela 8 - Estimativas de risco ajustado para resposta completa à nQRT, incluindo risco relativo, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo*; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

	β	SE	p-valor	RR	IC95%	
					Inferior	Superior
Sexo						
Masculino	0a					
Feminino	-0,018	0,057	0,745	0,98	0,88	1,10
Hábito consumo de álcool						
Etilista	0a					
Ex	-0,015	0,059	0,802	0,99	0,88	1,11
Não etilista	-0,121	0,061	0,451	0,89	0,79	1,00
Uso de AINH						
Não uso AINH	0a					
Uso AINH	-0,111	0,112	0,320	0,89	0,71	1,11
Razão neutrófilo/Linfócito						
RNL \leq 2,08	0a					
RNL $>$ 2,08	0,157	0,050	0,001	1,19	1,07	1,28

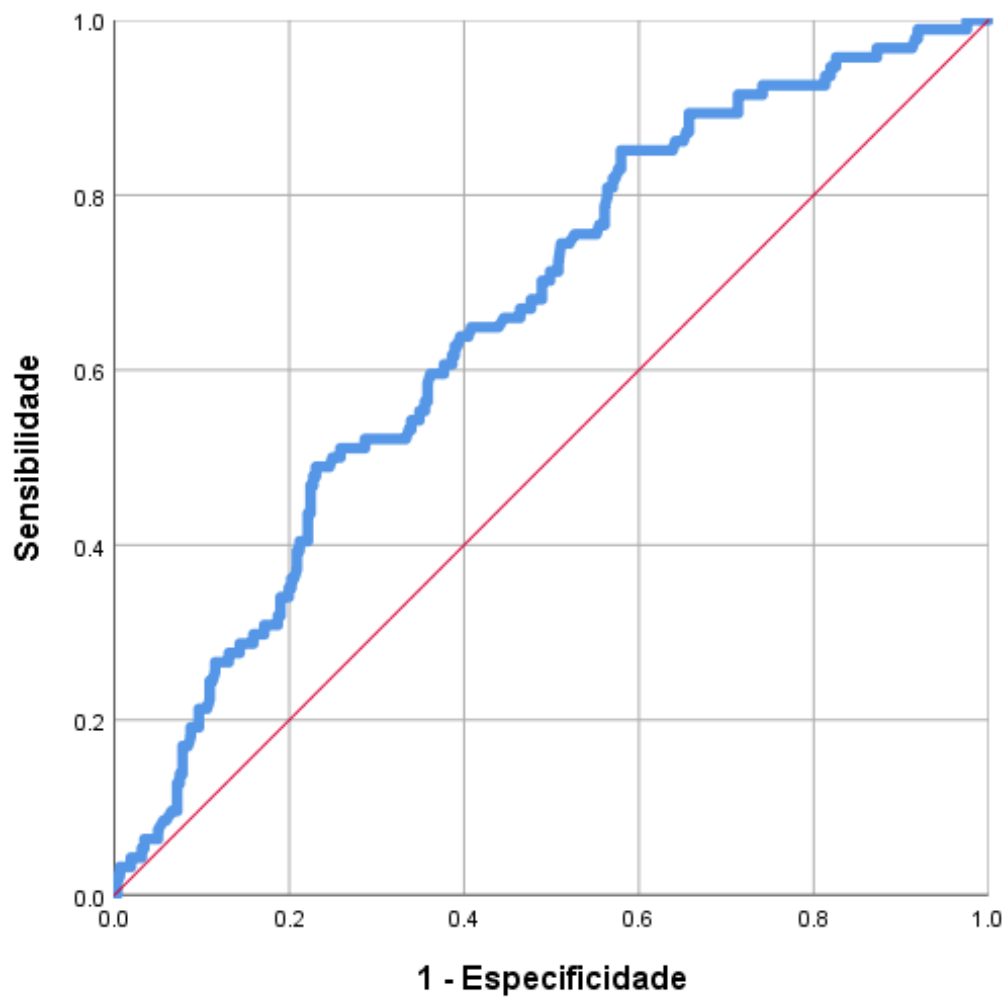
*Ajustado para idade e número de comorbidades.

0a - categoria de referência.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

O modelo obtido na Tabela 8 apresentou uma AUC de 0,659 (IC95%: 0,599 - 0,718), disponível no gráfico 3.

Gráfico 3 - Área sob a curva do modelo múltiplo apresentado na Tabela 8



Fonte: ICESP-HCFMUSP.

5 Discussão

O tratamento atual das neoplasias de reto envolve, frequentemente, a utilização de quimio e radioterapia pré-operatórias, com observação de diferentes graus de resposta nos pacientes, que varia entre a regressão tumoral completa e a ausência de qualquer sinal de regressão tumoral⁽³⁵⁾.

A resposta observada após nQRT pode ser avaliada de diversas maneiras: exame físico (toque retal), retoscopia, biópsia, ultrassonografia endoanal, tomografia de pelve, ressonância de pelve, tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, dentre outros; porém, sabe-se que nenhum destes métodos associa-se perfeitamente aos achados do exame anatomopatológico da peça cirúrgica, que é a mais fidedigna avaliação do real grau de resposta à terapia.

Um dos maiores desafios para os médicos que se dedicam ao tratamento dos tumores de reto, consiste em identificar adequadamente o grau de resposta à terapia neoadjuvante (avaliação da resposta clínica). Sabe-se que até 20%⁽¹⁷⁷⁾ dos pacientes operados após nQRT não apresentam neoplasia na peça cirúrgica; desta forma, estes pacientes, caso corretamente identificados, poderiam ser poupados do tratamento cirúrgico, que muitas vezes está associado a elevada morbidade e queda da qualidade de vida pós-operatória (estomias temporárias ou permanentes, distúrbios defecatórios, disfunção urinária e sexual)^(178, 179).

Como principais achados do presente trabalho, observamos que as relações RNL, RPL e RLM obtidas antes do início da nQRT estão associadas ao grau de resposta tumoral patológico pela classificação TRG, com acurácias comparáveis e estatisticamente significantes, ressaltando que RNL e RPL aumentam e RLM diminui proporcionalmente ao aumento dos graus de resposta tumoral.

O modelo linear generalizado múltiplo gerado a partir deste estudo confirmou a associação entre a RNL e o grau de resposta tumoral (TRG).

Na análise univariada, apenas 15,5% dos indivíduos com RNL maior que 2,08 foram classificados como resposta completa, enquanto no grupo RNL menor ou igual a 2,08 observou-se mais que o dobro desse número, ou seja, 35,7% dos indivíduos. O risco relativo de 2,3 sugere, então, que a RNL poderia ser um preditor da “ausência de resposta completa”. Este achado confirma observações semelhantes feitas por outros autores envolvendo inflamação associada ao tumor e resistência à nQRT^(163, 180-182).

O modelo ajustado também mostrou que a associação entre RNL e resposta completa permanece significativa quanto ajustada a outras características dos pacientes estudados, contudo numa magnitude menor, de 1,19, sugerindo que a incidência de resposta completa no grupo com RNL maior que 2,08 é 19% menor que no grupo com RNL menor ou igual a 2,08.

Como RNL e resposta completa são aqui avaliadas como variáveis binárias, pode-se tanto dizer que RNL maior que 2,08 é fator de risco independente para ausência de resposta completa, como também que RNL menor ou igual a 2,08 é fator protetor, favorecendo resposta completa.

Ressalta-se que esse modelo ajustado apresentou acurácia de 65,9% em relação à resposta completa, ou seja, com o conjunto de variáveis consideradas neste modelo seria possível prever resposta completa em 65,9% dos casos em que fosse aplicado, desde que na mesma base populacional.

Analisando-se o valor preditivo de resposta à nQRT dos marcadores inflamatórios RNL, RPL e RLM através de revisão de literatura sobre o assunto, constata-se que, apesar de estudos com associação negativa, há predominância de publicações com associação positiva. A Tabela 9 exemplifica estes achados conflitantes na literatura médica^(153-156, 163, 164, 180, 183-188) sobre o assunto.

Tabela 9 - Resultados conflitantes de diversos estudos sobre a relação entre RNL, RPL, RLM e a resposta patológica à nQRT

Autor	País	Ano	N	Variáveis	Achados
Shen L ⁽¹⁵⁵⁾	China	2014	199	RNL	RNL não associado à pCR.
Shen J ⁽¹⁸⁵⁾	China	2017	202	RNL	RNL não associado à pCR.
Dudani S ⁽¹⁶⁴⁾	Canadá	2019	1237	RNL e RPL	RNL e RPL não predizem pCR.
Zhang Y ⁽¹⁸⁶⁾	China	2020	472	RNL	RNL elevado: tendência a menor frequência de pCR (NS*).
Krauthamer M ⁽¹⁵⁴⁾	Israel	2013	140	RNL	RNL menor que 5 é associado à pCR.
Kim IY ⁽¹⁵⁶⁾	Coréia do Sul	2014	102	RNL	RNL maior ou igual a 3 está associado à ausência de pCR.
Hodek M ⁽¹⁸³⁾	República Tcheca	2016	173	RNL	RNL é associado a resposta patológica.
Li X ⁽¹⁵³⁾	China	2018	2620	RNL	RNL abaixo do valor de corte é associado à pCR.**
Kim TG ⁽¹⁶³⁾	Coréia do Sul	2019	176	RNL e RPL	RNL menor que 2 e RPL menor que 133,4 são associados à maior regressão tumoral.
Braun LH ⁽¹⁸⁰⁾	Alemanha	2019	220	RNL	RNL maior que 4,06 é associado à pior resposta patológica.
Jeon BH ⁽¹⁸⁸⁾	Coréia do Sul	2019	140	RNL	RNL maior que 2,77 é associado à menor frequência de pCR.
Li A ⁽¹⁶⁹⁾	China	2019	218	RNL, RPL e RLM	RNL, RPL e RLM predizem pCR.
Xu N ⁽¹⁸⁹⁾	China	2022	205	RNL e RPL	RNL maior ou igual a 3,1 é associado à pior resposta à nQRT.
Shi X ⁽¹⁹⁰⁾	China	2022	59	RNL e RLM	RNL e RLM são preditores de pCR.
Coser RB***	Brasil	2023	396	RNL, RPL e RLM	RNL, RPL e RLM estão associados à resposta patológica à nQRT.

*NS – Sem significância estatística.

** Revisão sistemática e metanálise.

*** Estudo enviado para publicação.

Pode-se propor várias explicações para tais discrepâncias entre os estudos; uma delas seria decorrente das variações dos valores destes marcadores de acordo com as características de cada população.

Shen et al.⁽¹⁵⁵⁾ em estudo realizado na China com 199 pacientes não encontraram associação entre RNL e resposta à nQRT, apesar de tendência de valor mais elevado de RNL entre os pacientes TRG 2-3: 2,82 em comparação com os TRG 0-1: 2,68; $p=0,873$.

Em outro estudo com número maior de pacientes, Dudani et al.⁽¹⁶⁴⁾ também não observaram capacidade de RNL e RPL predizerem pCR, salientando-se que, neste caso, o valor de corte adotado para RNL foi baseado em outros estudos, além do fato de nem todos os pacientes terem terminado a nQRT e alguns terem realizado a coleta do hemograma após o início da nQRT.

Por outro lado, Krauthamer et al.⁽¹⁵⁴⁾ observaram maior índice de resposta completa em pacientes com RNL menor que 5 em população de Israel, e Li et al.⁽¹⁵³⁾ em metanálise com 18 estudos avaliando câncer de reto e de outras localizações, verificaram associação entre RNL e pCR em estudos da Ásia (RR=1,82; IC95%: 1,18-2,81) e América no Norte (RR=1,64; IC95%: 1,03-2,61) e ausência de associação em estudos europeus (RR=1,73; IC95%: 0,92-3,27).

Fato interessante é que os valores de corte de RNL também variam de acordo com o desfecho estudado, o que pode ser ilustrado por estudo sul-coreano⁽¹⁸⁸⁾ de 2019, que mostrou valor de corte de 2,77 para ausência de resposta completa e de 2,66 para menor sobrevida livre de doença.

Desta forma, a interpretação dos estudos com resultados negativos também deve levar em consideração o tamanho das amostras, a possibilidade de uso de diferentes tipos de nQRT na mesma população estudada e o fato de que alguns autores utilizaram dados de RNL calculados para prever sobrevida e os aplicaram para prever resposta à nQRT, ou ainda utilizaram valores de RNL calculados por outros autores como referência ao invés de calcular seu próprio valor de RNL^(164, 184, 186).

No presente estudo, as análises das variáveis RNL, RPL e RLM basearam-se em curvas ROC e índice de Youden para obtenção dos melhores valores de corte, ressaltando-se que distintos autores calcularam valores de corte diferentes para cada uma das variáveis.

Esses diferentes valores de corte podem ser explicados por variações das características das diferentes populações e/ou dos seus respectivos tumores^(154, 187, 188); o que demonstra a necessidade de se conhecer os parâmetros na população estudada, reforçando, desta forma, a importância do presente estudo.

As variações dos valores normais de RNL, RPL e RLM ocorrem de acordo com a localização geográfica, etnia e sexo.

A população oriental apresenta valores de RNL tipicamente mais baixos que a população ocidental, variando entre 1,55 e 1,58 de acordo com os sexos masculino e feminino; os valores de RPL variam entre 198,68 e 205,59, e os de RLM entre 5,14 e 5,50, segundo estudo realizado por Wang et al.⁽¹⁹¹⁾ na China, envolvendo 404.272 pacientes.

Já na população ocidental, estudo norte-americano⁽¹⁹²⁾ com 9.427 pacientes sem diagnóstico de câncer ou uso de medicações (corticoides e anti-inflamatórios) descreveu valor médio normal para RNL de 2,15. O valor de RNL foi menor na subpopulação negra não hispânica (1,76) e hispânica (2,08), quando comparado à subpopulação branca não hispânica (2,24), não havendo diferenças referentes à ingestão de bebida alcoólica, porém, o hábito de fumar e a obesidade relacionaram-se à valores mais elevados de RNL.

Apesar de não serem encontrados valores normais de RNL para a população brasileira, Huguet et al.⁽¹⁹³⁾ descreveram valores de RNL de 2,21 na população argentina, em estudo com 71.873 pacientes, achados similares aos descritos para a população norte-americana.

A RNL média observada no presente estudo foi 2,7 (população portadora de neoplasia de reto), valor este superior às médias de valores normais para todas as populações estudadas (sem diagnóstico de câncer) descritas anteriormente.

Considerando-se o fato de que as neoplasias estão intimamente relacionadas à inflamação, poder-se-ia supor que a RNL média aumentada na população deste estudo relaciona-se à presença de neoplasia nos pacientes.

Também poder-se-ia supor que o achado de pior resposta à nQRT em pacientes com RNL maior que 2,08 seria mais evidente na subpopulação de pacientes negros, tendo em vista seu RNL basal menor, como mostrado por Azab et al.⁽¹⁹²⁾.

Outro fator que tem grande importância no contexto deste estudo são os elevados custos envolvidos no tratamento dos pacientes com neoplasia de reto. Salienta-se que a obtenção de RNL, RPL e RLM envolve custos muito baixos e, dentre os diversos possíveis fatores preditores de resposta à nQRT citados anteriormente (marcadores moleculares, exames de imagem e histopatológicos), o hemograma é definitivamente o de menor custo, com valor sugerido de R\$ 21,36 em 2022⁽¹⁹⁴⁾, valor este que não geraria impacto nos custos gerais do tratamento do paciente, mesmo no contexto de saúde pública, somando-se ao fato de que praticamente todos os pacientes em tratamento por neoplasia de reto já realizam hemograma rotineiramente antes de iniciar o tratamento.

Desta forma, o presente estudo agrega uma ferramenta de baixíssimo custo e amplamente disponível ao arsenal de manejo do câncer de reto, com foco na individualização do tratamento para obtenção do melhor resultado possível para cada paciente.

A RNL, então, pode ser incorporada ao arsenal de preditores de resposta à nQRT para tumores de reto. Valores de RNL maiores que 2,08 podem colaborar na identificação de pacientes não respondedores, permitindo que estes pacientes sejam selecionados para

tratamentos pré-operatórios mais agressivos ou até colaborar para a indicação de terapia adjuvante em casos duvidosos.

De forma alternativa, pacientes com RNL menor que 2,08 podem apresentar biologia tumoral mais favorável ou apresentar maior sensibilidade à nQRT, com maior chance de alcançar resposta clínica completa e, eventualmente, serem poupados do tratamento cirúrgico.

Cabe, neste momento, explorar a associação entre a contagem dos elementos circulantes no sangue periférico e os graus de resposta à terapia neoadjuvante.

Como resultado desta exploração, observou-se associação entre frequência elevada de pCR (TRG 0) e taxas elevadas de hemoglobina ($p=0,049$), achado que coincide com os de Runau et al.⁽¹⁹⁵⁾ Uma possível explicação para tal achado, segundo o mesmo autor, pode ser dada pelos efeitos da anemia no microambiente tumoral, contribuindo para hipóxia e instabilidade genética, o que poderia aumentar a agressividade do tumor, reduzindo sua sensibilidade à nQRT.

De modo oposto, observou-se associação entre maior índice de resposta incompleta à nQRT e elevada contagem de neutrófilos ($p=0,011$) e monócitos ($p=0,049$), fato que pode refletir os preponderantes efeitos pró-tumorais destas linhagens celulares - efeitos estes que também podem ser observados por meio de estudo relacionando número elevado de neutrófilos à pior sobrevida em pacientes com câncer colorretal⁽¹⁹⁶⁾, bem como por metanálise de 2019⁽¹⁹⁷⁾, que mostrou relação entre número elevado de monócitos e pior prognóstico em pacientes com esta mesma afecção.

Quanto à contagem de plaquetas, Naschitz et al.⁽¹⁹⁸⁾ observaram que cerca de um terço dos pacientes com câncer em seu estudo apresentavam trombocitose ao diagnóstico, enquanto outros autores^(199, 200) observaram relação entre trombocitose e recidiva, e trombocitose e sobrevida, em pacientes com câncer colorretal. No presente estudo, o

número médio de plaquetas no grupo resposta completa (275.409) foi menor que no grupo resposta incompleta (297.508), mas sem significância estatística ($p=0,07$); porém, quando se comparou o grupo “boa resposta” (TRG 0-1) com o grupo “resposta ruim” (TRG 2-3), observou-se diferença estatisticamente significativa, com média do número de plaquetas menor no grupo “boa resposta” (273.442 versus 305.524), $p=0,001$. Estes achados apontam para o mesmo sentido que o estudo de Kawai et. al. ⁽²⁰¹⁾ de 2013, relacionando número de plaquetas a TRG.

O número elevado de linfócitos no sangue periférico pode ser utilizado como preditor de resposta completa após nQRT em tumores localmente avançados de reto^(202, 203), mas essa associação não foi estatisticamente significativa ($p=0,094$) neste trabalho.

Quanto ao número de eosinófilos no sangue periférico, há evidência da associação entre contagem elevada de eosinófilos e pior prognóstico em neoplasias de canal anal ⁽²⁰⁴⁾, apontando para um possível efeito negativo dos eosinófilos neste contexto. No mesmo sentido, observou-se, no presente estudo, associação entre resposta completa à nQRT e baixa contagem de eosinófilos no sangue periférico ($p=0,032$).

Voltando, agora, para os marcadores inflamatórios do sangue periférico (RNL, RPL e RLM), percebe-se, então, que estas razões podem traduzir, de forma simplificada, o complexo equilíbrio entre os efeitos pró e antitumorais das células inflamatórias. Das células que compõem os marcadores RNL, RPL e RLM, salienta-se seus efeitos no MT - os neutrófilos, monócitos e plaquetas com efeitos predominantemente pró-tumorais ^(52, 53, 138, 139, 141, 143, 144, 205) em contraste com os linfócitos e seus efeitos predominantemente antitumorais^(112, 206). Desta forma, valores elevados de RNL e RPL refletem a predominância de efeitos pró-tumorais dos neutrófilos e plaquetas, associados à baixa participação antitumoral dos linfócitos, apontando para um comportamento tumoral mais agressivo e, conseqüentemente, menores taxas de resposta à nQRT. Alternativamente,

valores elevados de RLM refletem a predominância de efeitos antitumorais dos linfócitos, associados à baixa participação pró-tumoral dos monócitos, apontando para um comportamento tumoral menos agressivo e, conseqüentemente, maiores taxas de resposta à nQRT.

Estas observações também podem justificar os achados de outros estudos, de que valores elevados de RNL^(74, 150) e RPL⁽¹⁶³⁾, assim como valores baixos de RLM⁽¹⁶⁹⁾ associam-se a pior prognóstico em pacientes com neoplasias de reto.

Apesar de não fazerem parte do objetivo do presente estudo, verificou-se que outras variáveis patológicas e laboratoriais se comportaram de acordo com as expectativas. Quanto às patológicas, observou-se menor número de metástases linfonodais nos pacientes com TRG 0, dados consistentes com os observados por Park et al⁽²⁰⁷⁾.

Quanto às variáveis laboratoriais, destaca-se o antígeno carcinoembrionário (CEA), amplamente utilizado no seguimento de pacientes tratados por neoplasias colorretais para monitorar recidivas pós-operatórias. O presente estudo observou dosagem média de CEA pré-nQRT de 8,2 ng/ml nos pacientes com pCR em contraste com média de 18,1 ng/ml nos pacientes com resposta incompleta ($p < 0,001$), achados que estão de acordo com a metanálise realizada em 2016 por Tsai et al.⁽²⁰⁸⁾, que observou níveis de CEA pré-nQRT inferiores a 5ng/ml associados à pCR e a maior grau de regressão tumoral.

Por fim, considerando-se as complexas interações entre câncer e inflamação, observou-se que outros fatores clínicos relacionados aos pacientes poderiam ter ação direta no tumor ou alterar seu “status” inflamatório e, conseqüentemente, ter participação na resposta do tumor à nQRT, tornando-se possíveis variáveis de confusão. Tais fatores

não foram abordados por estudos anteriores, sendo sua ausência considerada, inclusive, como fator limitante desses estudos^(156, 182).

Dentre estes fatores, foram considerados o tabagismo, o etilismo, o uso de habitual de medicações (excetuando-se aquelas relacionadas às condições descritas como critérios de exclusão) e a presença ou não de comorbidades.

Apesar de dados apontando para a relação entre tabagismo e aumento da incidência de câncer de reto⁽²⁰⁹⁾, a análise da associação entre resposta patológica completa e o tabagismo não mostrou significância estatística quando se avaliou o hábito ou não de fumar ($p=0,464$), assim como o volume de tabaco consumido ($p=0,320$).

Da mesma forma que o tabagismo, o consumo de álcool também está associado ao aumento da incidência de câncer de reto⁽²¹⁰⁾, mas não se associou de forma significativa à resposta patológica completa à nQRT no presente estudo ($p=0,564$).

Quanto às medicações, observa-se interesse no estudo dos efeitos de diversas drogas no câncer colorretal; uma delas é o ácido acetilsalicílico, que possivelmente poderia apresentar efeito positivo no prognóstico dos pacientes, além de colaborar com a melhora das taxas de resposta à nQRT⁽²¹¹⁾. Outras medicações possivelmente associadas a efeitos antitumorais são os anti-hipertensivos (inibidores da enzima de conversão de angiotensina e os bloqueadores de receptores de angiotensina), encontrando-se dados relacionando o uso destas medicações ao aumento da taxa de pCR⁽²¹²⁾. Os dados do presente estudo apontam para a mesma direção, observando-se associação entre resposta completa e o uso de medicamentos anti-hipertensivos ($p=0,012$) e antiagregantes plaquetários/anticoagulantes ($p=0,045$).

Outra medicação estudada quanto aos seus possíveis efeitos antitumorais é a metformina, utilizada no tratamento do diabetes e associada à redução do risco de câncer colorretal⁽²¹³⁾. Há dados relacionando esta medicação à possível efeito positivo na

resposta tumoral à nQRT⁽²¹⁴⁾. No presente estudo não foi observada relação entre o uso de hipoglicemiantes e resposta à nQRT ($p=0,641$).

Salienta-se que as medicações foram estudadas de acordo com o agrupamento em classes, e não por drogas individuais, o que não permite estabelecer relações entre drogas específicas e seus efeitos, mas pode-se supor que, dentre os antiagregantes plaquetários/anticoagulantes, o ácido acetilsalicílico provavelmente está entre as drogas mais frequentemente utilizadas, da mesma forma que dentre os anti-hipertensivos, os inibidores da enzima de conversão de angiotensina e os bloqueadores de receptores de angiotensina estão provavelmente entre as medicações mais utilizadas e, da mesma forma, dentre os hipoglicemiantes, a metformina está provavelmente entre as medicações mais utilizadas.

Quanto às outras características estudadas, também se observou menor número de homens ($p=0,021$) no grupo resposta completa, dado que poderia eventualmente relacionar-se a tumores inicialmente mais avançados nestes pacientes; achado este que não faz parte do objetivo deste estudo e demanda investigação mais detalhada.

Também se observou maior número de comorbidades no grupo de pacientes com resposta completa ($p=0,001$); uma hipótese para tal achado poderia consistir no fato dos pacientes com comorbidades utilizarem mais medicações como anti-hipertensivos e antiagregantes plaquetários/anticoagulantes, por sua vez relacionados à melhor resposta à nQRT; porém, o mesmo achado não foi observado na análise dos grupos “boa resposta” (TRG 0-1) *versus* “resposta ruim” (TRG 2-3), com $p=0,085$, achado que também não faz parte do objetivo do estudo e também demanda investigação mais detalhada.

5.1 Limitações do estudo

O presente estudo apresenta algumas limitações, dentre as quais deve-se salientar que a análise anatomopatológica foi realizada por mais de um patologista, o que pode gerar diferentes interpretações quanto aos graus de resposta tumoral, apesar da padronização da classificação, uma vez que há certo grau de subjetividade implícito na classificação TRG.

Como o estudo não foi prospectivo, alguns dados clínicos e laboratoriais não estavam disponíveis para todos os pacientes, como albumina, proteína C reativa e índice de massa corpórea. Estes fatores podem relacionar-se à inflamação e, desta forma, influenciar na resposta à nQRT.

Os pacientes sabidamente metastáticos antes do início da nQRT não foram analisados, portanto, os resultados atuais não podem ser extrapolados para este grupo de pacientes.

6 Conclusão

Dentre os pacientes com neoplasia de reto submetidos a quimio e radioterapia neoadjuvantes (nQRT), existe relação entre os marcadores de resposta inflamatória sistêmica no sangue periférico (RNL, RPL e RLM) e os graus de resposta ao tratamento neoadjuvante, de acordo com a classificação TRG.

RNL maior que 2,08 é fator preditivo independente para resposta patológica incompleta à nQRT em pacientes com câncer de reto.

Anexo A - Autorização para execução do projeto de pesquisa



São Paulo, 10 de setembro de 2018.

Registro: NP 1372//18

Ref. Solicitação de execução de estudo: **Avaliação de marcadores inflamatórios sistêmicos baseados em contagem de elementos circulantes no sangue periférico em pacientes com neoplasia de reto distal: valor preditivo na avaliação de resposta à terapia neoadjuvante.**

Pesquisador Responsável: Dr. Carlos Frederico Sparapan Marques
Pesquisador Executante: Dr. Roger Beltrati Coser

CONSIDERAÇÕES

Trata-se de um estudo retrospectivo com a finalidade de obtenção de título acadêmico. O projeto visa avaliar a utilidade de marcadores imunológicos sistêmicos (relação neutrófilos/linfócitos, relação plaquetas/linfócitos, e relação monócitos/linfócitos) pré-operatórios como preditores de resposta a quimio e radioterapia neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto distal. Serão incluídos pacientes com diagnóstico supramencionado no período de 2011 e 2015 atendidos nesta Instituição.

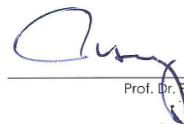
RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Antes do início das atividades relacionadas ao estudo:

- Apresentar a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP para execução no ICESP conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde;
- Enviar anualmente o status ou relatório do estudo. Projetos sem informações por mais de 1 ano serão cancelados automaticamente e impedirá a submissão de novos projetos pelos investigadores;
- Enviar resultados do projeto (publicações, defesa de tese, apresentação em congressos e outros);

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA

Atenciosamente,



Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral
Fundação Faculdade de Medicina
ICESP

Versão 2.0 28 de Dezembro de 2017.



Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP - 01246-000 - Tel: 11 3893.2000 - www.icesp.org.br

**Anexo B - Parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa Fundação
Faculdade de Medicina – Faculdade de Medicina da USP – SP**

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de Marcadores Inflamatórios Sistêmicos Baseados em Contagem de Elementos Circulantes no Sangue Periférico em Pacientes com Neoplasia de Reto Distal: Valor Preditivo na Avaliação da Resposta à Terapia Neoadjuvante

Pesquisador: CARLOS FREDERICO SPARAPAN MARQUES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 02512818.2.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.213.540

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo retrospectivo para obtenção de título de doutorado, no qual serão analisados prontuários de pacientes com adenocarcinoma de reto localmente avançado, tratados com quimioterapia e radioterapia neoadjuvantes seguido de cirurgia.

Serão avaliados cerca de 150 prontuários.

O autor postula que o processo inflamatório, aqui avaliados através de marcadores inflamatórios sistêmicos derivados do sangue periférico, como neutrófilos e plaquetas, gerado pelo tumor, pode estar relacionado ao prognóstico do paciente tratado.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a utilidade de marcadores imunológicos sistêmicos (relação neutrófilos/linfócitos, relação plaquetas/linfócitos, e relação monócitos/linfócitos) pré operatórios como preditores de resposta a quimio e radioterapia neoadjuvante em pacientes com neoplasia de reto distal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não apresenta riscos aos pacientes.

Sem benefício direto aos pacientes já tratados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo se justifica através da busca de marcadores prognósticos e preditivos que contribuam

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903

UF: SP **Município:** SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.213.540

para selecionar mais racionalmente o melhor tratamento para cada paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Resposta ao parecer 3.156.988 de 20/02/19.

Protocolo de pesquisa v2.0, com acréscimo da seguinte sentença: "Caso durante a realização do projeto seja identificado algum resultado que seja do interesse dos participantes ou que possa alterar de alguma forma seu tratamento, estes serão devidamente informados, garantindo-se o direito à informação."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1197260.pdf	08/03/2019 14:48:57		Aceito
Outros	RespostaPendencia.pdf	08/03/2019 14:48:42	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisa_v2_alteracoesdestaque.docx	08/03/2019 14:48:26	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Outros	RespostaCEP.docx	10/01/2019 14:51:54	ROGER BELTRATI COSER	Aceito
Outros	AprovacaoICESP.pdf	05/11/2018 14:32:14	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Outros	Anexoll.pdf	05/11/2018 14:30:39	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DispensaTCLE.pdf	05/11/2018 14:28:47	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	05/11/2018 14:26:34	Evelise Pelegrinelli Zaidan	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.213.540

SAO PAULO, 21 de Março de 2019

Assinado por:

**Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
(Coordenador(a))**

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo C - Demais características anatomopatológicas da população estudada (variáveis qualitativas); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	n	% (IC95%)	
Grau*	Resposta Completa	76	21,1 (16,7-25,9)
	Bem diferenciado	17	4,7 (0,3-9,5)
	Moderadamente diferenciado	256	71,1 (66,7-75,9)
	Pouco diferenciado	11	3,1 (0,0-7,8)
Configuração Macroscópica*	Resposta Completa	73	19,8 (14,7-25,2)
	Ulcerado	152	41,3 (36,1-46,6)
	Infiltrativo	61	16,6 (11,4-21,9)
	Exofítica	14	3,8 (0,0-9,1)
	Plana	8	2,2 (0,0-7,5)
	Estenosante	4	1,1 (0,0-6,4)
	Deprimida	3	0,8 (0,0-6,1)
	Ulceroinfiltrativo	53	14,4 (9,2-19,7)
TRG*	0	76	20,1 (14,8-25,5)
	1	70	18,5 (13,2-23,9)
	2	133	35,1 (29,8-40,5)
	3	100	26,4 (21,1-31,8)
Budding*	Presente	63	18,4 (14,6-22,6)
	Ausente	279	81,6 (77,8-85,8)
Invasão Linfática*	Presente	50	13,4 (10,2-16,8)
	Ausente	324	86,6 (83,4-90,0)
Invasão Vascular*	Presente	38	10,1 (7,4-13,2)
	Ausente	338	89,9 (87,2-93,0)
Invasão perineural*	Presente	77	20,5 (16,5-24,5)
	Ausente	299	79,5 (75,5-83,5)
Perfuração*	Presente	12	3,3 (1,9-5,2)
	Ausente	354	96,7 (95,4-98,6)
Margem Distal*	Livre	375	98,9 (98,2-99,9)
	Comprometida	4	1,1 (0,3-2,0)
Margem Radial*	Livre	359	94,7 (92,9-97,0)
	Comprometida	20	5,3 (3,4-7,5)
Ampliação de Margem*	Sim	4	4,5 (1,1-8,4)
	Não	84	95,5 (92,0-99,3)

* Características qualitativas: frequência absoluta, relativa e intervalo de confiança de 95%(IC95%).
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Anexo D - Demais características anatomopatológicas da população estudada (variáveis quantitativas); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	n	Ausentes	Média (\pm DP)	Mediana(IIQ)	Min-Max
Tamanho do Tumor (cm)	379	17	2,7 (\pm 2,2)	2,5 (1,0-3,8)	0,0-13,0
Número de Linfonodos Retirados	379	17	22,6 (\pm 13,8)	20,0 (14,0-28,0)	1,0-116,0
Número de Linfonodos Comprometidos	379	17	0,9 (\pm 2,3)	0,0 (0,0-1,0)	0,0-27,0

** Características quantitativas: média (\pm desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) e nível descritivo.
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Anexo E - Análise de Bonferrone para as variáveis que apresentaram significância estatística entre os diferentes estratos do grau de resposta tumoral (TRG); ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

	Grupo1	Grupo2	N1	N2	p	P ajustado
Sexo	TRG 0	TRG 1	93	70	0,876	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,009	0,055
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,008	0,051
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,011	0,064
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,010	0,057
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,838	1,000
Medicação Anti-hipertensiva	TRG 0	TRG 1	93	70	0,021	0,124
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,017	0,102
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,177	1,000
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,836	1,000
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,325	1,000
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,414	1,000
Hb (g/dL)	TRG 0	TRG 1	93	70	0,442	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,012	0,075
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,018	0,106
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,002	0,011
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,003	0,018
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,975	1,000
Ht (%)	TRG 0	TRG 1	93	70	0,69	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,009	0,054
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,037	0,22
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,005	0,029
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,019	0,117
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,692	1,000
Leucócitos (Número/mm3)	TRG 0	TRG 1	93	70	0,731	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,165	0,99
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,003	0,016
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,367	1,000
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,016	0,093
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,065	0,392

	Grupo1	Grupo2	N1	N2	p	P ajustado
Neutrófilos (Número / mm ³)	TRG 0	TRG 1	93	70	0,481	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,086	0,516
	TRG 0	TRG 3	93	100	<0,001	0,002
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,414	1,000
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,008	0,047
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,026	0,158
Monócitos (Número / mm ³)	TRG 0	TRG 1	93	70	0,893	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,109	0,653
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,003	0,016
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,107	0,643
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,004	0,022
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,103	0,619
Plaquetas (Número / mm ³)	TRG 0	TRG 1	93	70	0,7	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,089	0,536
	TRG 0	TRG 3	93	100	0,007	0,041
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,049	0,294
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,004	0,023
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,228	1,000
RNL	TRG 0	TRG 1	93	70	0,148	0,89
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,003	0,020
	TRG 0	TRG 3	93	100	<0,001	<0,001
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,254	1,000
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,007	0,045
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,061	0,364
RPL	TRG 0	TRG 1	93	70	0,474	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,005	0,032
	TRG 0	TRG 3	93	100	<0,001	0,002
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,075	0,45
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,008	0,048
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,255	1,000
RLM	TRG 0	TRG 1	93	70	0,392	1,000
	TRG 0	TRG 2	93	133	0,005	0,028
	TRG 0	TRG 3	93	100	<0,001	<0,001
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,095	0,567
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,003	0,016
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,095	0,572

	Grupo1	Grupo2	N1	N2	p	P ajustado
CEA (ng/ml)	TRG 0	TRG 1	92	66	0,215	1,000
	TRG 0	TRG 2	92	130	<0,001	<0,001
	TRG 0	TRG 3	92	95	<0,001	0,001
	TRG 1	TRG 2	66	130	0,01	0,063
	TRG 1	TRG 3	66	95	0,021	0,123
	TRG 2	TRG 3	130	95	0,906	1,000
Tamanho (cm)	TRG 0	TRG 1	76	70	<0,001	<0,001
	TRG 0	TRG 2	76	133	<0,001	<0,001
	TRG 0	TRG 3	76	100	<0,001	<0,001
	TRG 1	TRG 2	70	133	<0,001	<0,001
	TRG 1	TRG 3	70	100	<0,001	<0,001
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,066	0,397
LN comprometidos	TRG 0	TRG 1	76	70	0,016	0,093
	TRG 0	TRG 2	76	133	<0,001	<0,001
	TRG 0	TRG 3	76	100	<0,001	<0,001
	TRG 1	TRG 2	70	133	0,122	0,733
	TRG 1	TRG 3	70	100	0,189	1,000
	TRG 2	TRG 3	133	100	0,859	1,000

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Anexo F - Características clínicas qualitativas estratificadas de acordo com as categorias TRG 0 e 1 (resposta boa) versus TRG 2 e 3 (resposta ruim), incluindo frequência absoluta, relativa, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	TRG 0-1		TRG 2-3		p-valor*
	n	%(IC95%)	n	%(IC95%)	
Sexo Masculino	71	43,6%(36,2%-51,7%)	145	62,2%(56,2%-68,9%)	0,021
Tabagista	16	10,1%(2,5%-18,8%)	42	18,3%(11,7%-25,5%)	0,460
Ex-tabagista	67	42,4%(34,8%-51,0%)	99	43,0%(36,5%-50,3%)	
Etilista	23	15,1%(7,9%-22,4%)	54	24,1%(17,4%-31,0%)	0,564
Ex-etilista	26	17,1%(9,9%-24,3%)	51	22,8%(16,1%-29,7%)	

*Valor de p baseado no teste de qui-quadrado ou teste exato de Fischer.
Fonte: ICESP-HCFMUSP.

Anexo G - Características quantitativas estratificadas de acordo com as categorias TRG 0 e 1 (resposta boa) versus TRG 2 e 3 (resposta ruim), incluindo frequência absoluta, relativa, intervalo de confiança de 95% (IC95%) e nível descritivo; ICESP-HCFMUSP entre junho de 2011 e janeiro de 2016

Variável	TRG 0-1 Média(±DP)	TRG 2-3 Média(±DP)	p-valor*
Idade(anos)	59,9(±12,5)	60,9(±12,1)	0,519
Número comorbidades	1,3(±1,3)	1,1(±1,2)	0,085
Tabagista(maços-ano)	31,7(±27,0)	30,6(±22,7)	0,940
Hb (g/dL)	13,2(±1,8)	12,4(±2,2)	<0,001
Ht (%)	39,7(±4,6)	37,9(±5,5)	<0,001
Leucócitos **	7.547,1(±1.970,5)	8.216,0(±2.480,1)	0,008
Neutrófilos **	4.591,7(±1.532,5)	5.184,5(±2.026,0)	0,002
Eosinófilos **	237,5(±198,7)	306,6(±291,0)	0,024
Basófilos **	33,7(±20,2)	38,1(±24,5)	0,085
Linfócitos **	2.058,2(±644,5)	1.971,5(±666,5)	0,146
Monócitos **	626,0(±212,3)	715,3(±281,4)	0,002
Plaquetas **	273.441,7(±77.955,9)	305.523,6(±100.996,6)	0,001
RNL	2,4(±1,2)	2,9(±1,6)	<0,001
RPL	148,2(±80,4)	173,4(±89,8)	<0,001
RLM	3,5(±1,3)	3,0(±1,3)	<0,001
CEA (ng/ml)	9,7(±20,9)	20,0(±38,4)	<0,001
Tamanho do tumor(cm)	1,2(±1,7)	3,6(±1,9)	<0,001
Número linfonodos comprometidos	0,5(±1,4)	1,1(±2,7)	<0,001
Número linfonodos ressecados	21,4(±12,3)	23,4(±14,6)	0,228

*Valor de p baseado no teste de Mann-Whitney.

** Número/mm³.

Fonte: ICESP-HCFMUSP.

8 Referências

1. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Intestino. [internet] Acesso em 03/01/2023. Última atualização em 24/11/2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
3. Nahas SC, Marques CF, Araújo SA, Aisaka AA, Nahas CS, Pinto RA, et al. [Colonoscopy as a diagnostic and therapeutic method of the large bowel diseases: analysis of 2,567 exams]. *Arq Gastroenterol*. 2005;42(2):77-82.
4. Coser RB, Dalio MB, Martins LCP, Alvarenga GF, Cruz CA, Imperiale AR, et al. Colonoscopy complications: experience with 8968 consecutive patients in a single institution. *Rev Col Bras Cir*. 2018;45(4):e1858.
5. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993;329(27):1977-81.
6. Janeway H. The treatment of cancer, particularly of the tongue, tonsils and rectum by buried emanation. *Am J Roentgenol*. 1920. p. 92.
7. Miles W. A method of performing abdomino-perineal excision for carcinoma of the rectum and of the terminal portion of the pelvic colon. *The Lancet* 1908. p. 1812-3.
8. Wood WQ, Wilkie DPD. Carcinoma of the Rectum. An Anatomico-Pathological Study. *Edinb Med J*. 1933;40(7):321-43.
9. WB G. Perineo-abdominal excision of the rectum in one stage. *Lancet*. 1934;2:69-74.

10. Dixon C. Surgical removal of lesions occurring in the sigmoid and rectosigmoid. *The American Journal of Surgery: Elsevier*; 1939. p. 12-7.
11. Dixon CF. Anterior Resection for Malignant Lesions of the Upper Part of the Rectum and Lower Part of the Sigmoid. *Ann Surg.* 1948;128(3):425-42.
12. Heald RJ, Ryall RD. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet.* 1986;1(8496):1479-82.
13. Gastrointestinal Tumor Study Group. Prolongation of the disease-free interval in surgically treated rectal carcinoma. *N Engl J Med.* 1985;312(23):1465-72.
14. Cedermark B, Dahlberg M, Glimelius B, Pahlman L, Rutqvist LE, Wilking N, et al. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* 1997;336(14):980-7.
15. Gérard A, Buyse M, Nordlinger B, Loygue J, Pène F, Kempf P, et al. Preoperative radiotherapy as adjuvant treatment in rectal cancer. Final results of a randomized study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Ann Surg.* 1988;208(5):606-14.
16. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL, Wieand HS, Collins RT, Beart RW, et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324(11):709-15.
17. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med.* 2001;345(9):638-46.
18. Cammà C, Giunta M, Fiorica F, Pagliaro L, Craxì A, Cottone M. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: A meta-analysis. *JAMA.* 2000;284(8):1008-15.
19. Sauer R, Fietkau R, Wittekind C, Rödel C, Martus P, Hohenberger W, et al. Adjuvant vs. neoadjuvant radiochemotherapy for locally advanced

- rectal cancer: the German trial CAO/ARO/AIO-94. *Colorectal Dis.* 2003;5(5):406-15.
20. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(17):1731-40.
21. Francois Y, Nemoz CJ, Baulieux J, Vignal J, Grandjean JP, Partensky C, et al. Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer: the Lyon R90-01 randomized trial. *J Clin Oncol.* 1999;17(8):2396.
22. Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L, Geisler DP, Dietz D, Lavery IC, et al. Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Ann Surg.* 2009;250(4):582-9.
23. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo LJ, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2010;11(9):835-44.
24. Kasi A, Abbasi S, Handa S, Al-Rajabi R, Saeed A, Baranda J, et al. Total Neoadjuvant Therapy vs Standard Therapy in Locally Advanced Rectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2020;3(12):e2030097.
25. Sammour T, Price BA, Krause KJ, Chang GJ. Nonoperative Management or 'Watch and Wait' for Rectal Cancer with Complete Clinical Response After Neoadjuvant Chemoradiotherapy: A Critical Appraisal. *Ann Surg Oncol.* 2017;24(7):1904-15.
26. Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U, Nadalin W, Gansl R, Sousa AH, et al. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. *Dis Colon Rectum.* 1998;41(9):1087-96.

27. Habr-Gama A. Assessment and management of the complete clinical response of rectal cancer to chemoradiotherapy. *Colorectal Dis.* 2006;8 Suppl 3:21-4.
28. Habr-Gama A, Perez R, Proscurshim I, Gama-Rodrigues J. Complete clinical response after neoadjuvant chemoradiation for distal rectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2010;19(4):829-45.
29. Habr-Gama A, Perez RO, São Julião GP, Proscurshim I, Gama-Rodrigues J. Nonoperative approaches to rectal cancer: a critical evaluation. *Semin Radiat Oncol.* 2011;21(3):234-9.
30. Dattani M, Heald RJ, Goussous G, Broadhurst J, São Julião GP, Habr-Gama A, et al. Oncological and Survival Outcomes in Watch and Wait Patients With a Clinical Complete Response After Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Rectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Ann Surg.* 2018;268(6):955-67.
31. Habr-Gama A, Perez RO, Nadalin W, Sabbaga J, Ribeiro U, Jr., Silva e Sousa AH, Jr., et al. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy: long-term results. *Ann Surg.* 2004;240(4):711-7; discussion 7-8.
32. Habr-Gama A, Gama-Rodrigues J, Sao Juliao GP, Proscurshim I, Sabbagh C, Lynn PB, et al. Local recurrence after complete clinical response and watch and wait in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: impact of salvage therapy on local disease control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014;88(4):822-8.
33. Lai CL, Lai MJ, Wu CC, Jao SW, Hsiao CW. Rectal cancer with complete clinical response after neoadjuvant chemoradiotherapy, surgery, or "watch and wait". *Int J Colorectal Dis.* 2016;31(2):413-9.
34. Nahas SC, Rizkallah Nahas CS, Sparapan Marques CF, Ribeiro U, Cotti GC, Imperiale AR, et al. Pathologic Complete Response in Rectal Cancer: Can We Detect It? Lessons Learned From a Proposed

- Randomized Trial of Watch-and-Wait Treatment of Rectal Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2016;59(4):255-63.
35. Hiotis SP, Weber SM, Cohen AM, Minsky BD, Paty PB, Guillem JG, et al. Assessing the predictive value of clinical complete response to neoadjuvant therapy for rectal cancer: an analysis of 488 patients. *J Am Coll Surg*. 2002;194(2):131-5; discussion 5-6.
36. Medich D, McGinty J, Parda D, Karlovits S, Davis C, Caushaj P, et al. Preoperative chemoradiotherapy and radical surgery for locally advanced distal rectal adenocarcinoma: pathologic findings and clinical implications. *Dis Colon Rectum*. 2001;44(8):1123-8.
37. Ryan JE, Warriar SK, Lynch AC, Ramsay RG, Phillips WA, Heriot AG. Predicting pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer: a systematic review. *Colorectal Dis*. 2016;18(3):234-46.
38. Alwers E, Jansen L, Kather J, Amitay E, Bläker H, Kloor M, et al. Response to neoadjuvant treatment among rectal cancer patients in a population-based cohort. *Int J Colorectal Dis*. 2021;36(1):177-85.
39. Huang Y, Lee D, Young C. Predictors for complete pathological response for stage II and III rectal cancer following neoadjuvant therapy - A systematic review and meta-analysis. *Am J Surg*. 2020;220(2):300-8.
40. Nahas SC, Nahas CSR, Cama GM, de Azambuja RL, Horvat N, Marques CFS, et al. Diagnostic performance of magnetic resonance to assess treatment response after neoadjuvant therapy in patients with locally advanced rectal cancer. *Abdom Radiol (NY)*. 2019;44(11):3632-40.
41. Perez RO, Habr-Gama A, São Julião GP, Lynn PB, Sabbagh C, Proscurshim I, et al. Predicting complete response to neoadjuvant CRT for distal rectal cancer using sequential PET/CT imaging. *Tech Coloproctol*. 2014;18(8):699-708.

42. Safatle-Ribeiro AV, Marques CFS, Pires C, Arraes L, Baba ER, Meirelles L, et al. Diagnosis of Clinical Complete Response by Probe-Based Confocal Laser Endomicroscopy (pCLE) After Chemoradiation for Advanced Rectal Cancer. *J Gastrointest Surg.* 2021;25(2):357-68.
43. Hur H, Kim NK, Min BS, Baik SH, Lee KY, Koom WS, et al. Can a biomarker-based scoring system predict pathologic complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? *Dis Colon Rectum.* 2014;57(5):592-601.
44. Duldulao MP, Lee W, Nelson RA, Li W, Chen Z, Kim J, et al. Mutations in specific codons of the KRAS oncogene are associated with variable resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in patients with rectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(7):2166-71.
45. Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, Sartori G, Fontana A, Malavasi N, et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and KRAS mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Br J Cancer.* 2010;103(7):1019-24.
46. Carlomagno C, Pepe S, D'Armiento FP, D'Armiento M, Cannella L, De Stefano A, et al. Predictive factors of complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer. *Oncology.* 2010;78(5-6):369-75.
47. Huh JW, Lee JH, Kim HR. Pretreatment expression of 13 molecular markers as a predictor of tumor responses after neoadjuvant chemoradiation in rectal cancer. *Ann Surg.* 2014;259(3):508-15.
48. Kudrimoti M, Lee EY, Kang Y, Ahmed M, Mohiuddin M. Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *J Ky Med Assoc.* 2007;105(1):18-22.
49. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917):860-7.

50. Cooper GM. The cell : a molecular approach. 2nd ed. Washington, D.C. Sunderland, Mass.: ASM Press; Sinauer Associates; 2000. xxiv, 689 p.
51. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
52. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
53. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315(26):1650-9.
54. Cavallo F, De Giovanni C, Nanni P, Forni G, Lollini PL. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(3):319-26.
55. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
56. Rothwell PM, Fowkes FG, Belch JF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2011;377(9759):31-41.
57. Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*. 2011;378(9809):2081-7.
58. Witz IP. Yin-yang activities and vicious cycles in the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2008;68(1):9-13.
59. Witz IP, Levy-Nissenbaum O. The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett*. 2006;242(1):1-10.
60. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):38-47.

61. Bindra RS, Glazer PM. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. *Mutat Res.* 2005;569(1-2):75-85.
62. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature.* 2006;441(7092):437-43.
63. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721-32.
64. Ehrlich P. Methodologische beitrage zur physiologie und pathologie der verschiedenen formen der leukocyten. *Zeitsch. Klin. Med.* 1880. p. 553 - 8.
65. Dancy JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976;58(3):705-15.
66. Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(20):3813-27.
67. Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med.* 2010;268(1):25-34.
68. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity.* 2002;17(4):413-23.
69. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 2003;19(4):583-93.
70. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2423-31.
71. Coffelt SB, Wellenstein MD, de Visser KE. Neutrophils in cancer: neutral no more. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(7):431-46.

-
72. Mei J, Liu Y, Dai N, Hoffmann C, Hudock KM, Zhang P, et al. Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(3):974-86.
 73. Deshmukh HS, Liu Y, Menkiti OR, Mei J, Dai N, O'Leary CE, et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to *Escherichia coli* K1 sepsis in neonatal mice. *Nat Med.* 2014;20(5):524-30.
 74. Templeton AJ, McNamara MG, Šeruga B, Vera-Badillo FE, Aneja P, Ocaña A, et al. Prognostic role of neutrophil-to-lymphocyte ratio in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(6):dju124.
 75. Waight JD, Hu Q, Miller A, Liu S, Abrams SI. Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *PLoS One.* 2011;6(11):e27690.
 76. Steinbach KH, Schick P, Trepel F, Raffler H, Döhrmann J, Heilgeist G, et al. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. *Blut.* 1979;39(1):27-38.
 77. Casbon AJ, Reynaud D, Park C, Khuc E, Gan DD, Schepers K, et al. Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(6):E566-75.
 78. Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1151-64.
 79. Blaisdell A, Crequer A, Columbus D, Daikoku T, Mittal K, Dey SK, et al. Neutrophils Oppose Uterine Epithelial Carcinogenesis via Debridement of Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Cell.* 2015;28(6):785-99.

-
80. Finisguerra V, Di Conza G, Di Matteo M, Serneels J, Costa S, Thompson AA, et al. MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature*. 2015;522(7556):349-53.
 81. Charles KA, Kulbe H, Soper R, Escorcio-Correia M, Lawrence T, Schultheis A, et al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest*. 2009;119(10):3011-23.
 82. Houghton AM, Rzymkiewicz DM, Ji H, Gregory AD, Egea EE, Metz HE, et al. Neutrophil elastase-mediated degradation of IRS-1 accelerates lung tumor growth. *Nat Med*. 2010;16(2):219-23.
 83. Di Mitri D, Toso A, Chen JJ, Sarti M, Pinton S, Jost TR, et al. Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature*. 2014;515(7525):134-7.
 84. Bodogai M, Moritoh K, Lee-Chang C, Hollander CM, Sherman-Baust CA, Wersto RP, et al. Immunosuppressive and Prometastatic Functions of Myeloid-Derived Suppressive Cells Rely upon Education from Tumor-Associated B Cells. *Cancer Res*. 2015;75(17):3456-65.
 85. Deryugina EI, Zajac E, Juncker-Jensen A, Kupriyanova TA, Welter L, Quigley JP. Tissue-infiltrating neutrophils constitute the major in vivo source of angiogenesis-inducing MMP-9 in the tumor microenvironment. *Neoplasia*. 2014;16(10):771-88.
 86. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12493-8.
 87. Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(7):2640-5.

88. Shojaei F, Wu X, Zhong C, Yu L, Liang XH, Yao J, et al. Bv8 regulates myeloid-cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature*. 2007;450(7171):825-31.
89. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015;522(7556):345-8.
90. Spicer JD, McDonald B, Cools-Lartigue JJ, Chow SC, Giannias B, Kubes P, et al. Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2012;72(16):3919-27.
91. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013.
92. Ramírez J, Lukin K, Hagman J. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(2):177-84.
93. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 1975;16(2):230-9.
94. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:257-86.
95. Magri G, Miyajima M, Bascones S, Mortha A, Puga I, Cassis L, et al. Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat Immunol*. 2014;15(4):354-64.
96. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):160-71.

97. Egerton M, Scollay R, Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(7):2579-82.
98. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 1999;402(6759):255-62.
99. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74(1):5-17.
100. Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(2):116-24.
101. Caza T, Landas S. Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets. *Biomed Res Int*. 2015;2015:521957.
102. Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Curr Opin Immunol*. 2009;21(2):153-60.
103. Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):8509-21.
104. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62(6):449-58.
105. Hamada H, Garcia-Hernandez MeL, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol*. 2009;182(6):3469-81.
106. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997;79(12):2320-8.

107. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014;20(14):3738-50.
108. MacCarty WC, Mahle AE. Relation of differentiation and lymphocytic infiltration to postoperative longevity in gastric carcinoma. *J. Lab. Clin. Med.* 1921. p. 473-80.
109. Galon J, Bruni D. Tumor Immunology and Tumor Evolution: Intertwined Histories. *Immunity.* 2020;52(1):55-81.
110. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960-4.
111. Galon J, Fridman WH, Pagès F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective. *Cancer Res.* 2007;67(5):1883-6.
112. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298-306.
113. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet.* 2018;391(10135):2128-39.
114. Volkman A, Gowans JL. The origin of macrophages from bone marrow in the rat. *Br J Exp Pathol.* 1965;46:62-70.
115. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(12):953-64.
116. Metchnikoff E. Untersuchungen ueber die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbeltiere. *Biologisches Centralblatt* 1883. p. 560-5.

117. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):399-416.
118. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
119. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*. 2005;8(3):211-26.
120. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23(11):549-55.
121. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1155-66.
122. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Plüddemann A, et al. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol*. 2006;176(8):5023-32.
123. Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.
124. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today*. 1992;13(7):265-70.
125. Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. 2007;67(18):8429-32.

126. Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin.* 1882;90(2):261-332.
127. Harker LA, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest.* 1969;48(6):963-74.
128. Bambace NM, Holmes CE. The platelet contribution to cancer progression. *J Thromb Haemost.* 2011;9(2):237-49.
129. Hoffman R. *Hematology: Basic Principles and Practice.* Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier; 2009.
130. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood.* 2000;96(10):3334-42.
131. Trousseau A. *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris:* Baillière; 1865.
132. Riess L. Zur pathologischen anatomie des blutes. *Arch Anat Physiol Wissensch Medical.* 1872;39:237-40.
133. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;61(1):46-52.
134. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, Balkwill F, Han HD, Bottsford-Miller J, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(7):610-8.
135. Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell.* 2018;33(6):965-83.
136. Sasaki K, Kawai K, Tsuno NH, Sunami E, Kitayama J. Impact of preoperative thrombocytosis on the survival of patients with primary colorectal cancer. *World J Surg.* 2012;36(1):192-200.

137. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost.* 2007;5(3):632-4.
138. Philippe C, Philippe B, Fouqueray B, Perez J, Lebret M, Baud L. Protection from tumor necrosis factor-mediated cytolysis by platelets. *Am J Pathol.* 1993;143(6):1713-23.
139. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 1999;59(6):1295-300.
140. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, et al. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 2012;72(2):440-8.
141. Zhang N, Zhang WJ, Cai HQ, Liu HL, Peng L, Li CH, et al. Platelet adhesion and fusion to endothelial cell facilitate the metastasis of tumor cell in hypoxia-reoxygenation condition. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28(1):1-12.
142. Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell.* 2013;24(1):130-7.
143. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(30):E3053-61.
144. Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):663-8.
145. Kim US, Papatestas AE. Letter: Peripheral lymphocyte counts in colonic disease. *Lancet.* 1974;2(7878):462-3.

146. Varenko IS, Lekakh VA, Shidlovskaja MP. [Significance of the ratio of blood lymphocytes to polymorphonuclear neutrophils in pneumonia and bronchitis patients]. *Vrach Delo*. 1985(8):102-3.
147. Zahorec R. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratisl Lek Listy*. 2001;102(1):5-14.
148. Bhat T, Teli S, Rijal J, Bhat H, Raza M, Khoueiry G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and cardiovascular diseases: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2013;11(1):55-9.
149. Szor DJ, Roncon Dias A, Pereira MA, Ramos MFKP, Zilberstein B, Ceconello I, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio is associated with prognosis in patients who underwent potentially curative resection for gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2018;117(5):851-7.
150. Walsh SR, Cook EJ, Goulder F, Justin TA, Keeling NJ. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2005;91(3):181-4.
151. Jung SW, Park IJ, Oh SH, Yeom SS, Lee JL, Yoon YS, et al. Association of immunologic markers from complete blood counts with the response to preoperative chemoradiotherapy and prognosis in locally advanced rectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(35):59757-65.
152. Sato H, Tsubosa Y, Kawano T. Correlation between the pretherapeutic neutrophil to lymphocyte ratio and the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with advanced esophageal cancer. *World J Surg*. 2012;36(3):617-22.
153. Li X, Dai D, Chen B, Tang H, Xie X, Wei W. The value of neutrophil-to-lymphocyte ratio for response and prognostic effect of neoadjuvant chemotherapy in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer*. 2018;9(5):861-71.

154. Krauthamer M, Rouvinov K, Ariad S, Man S, Walfish S, Pinsk I, et al. A study of inflammation-based predictors of tumor response to neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Oncology*. 2013;85(1):27-32.
155. Shen L, Zhang H, Liang L, Li G, Fan M, Wu Y, et al. Baseline neutrophil-lymphocyte ratio (≥ 2.8) as a prognostic factor for patients with locally advanced rectal cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation. *Radiat Oncol*. 2014;9:295.
156. Kim IY, You SH, Kim YW. Neutrophil-lymphocyte ratio predicts pathologic tumor response and survival after preoperative chemoradiation for rectal cancer. *BMC Surg*. 2014;14:94.
157. Menczer J. Preoperative elevated platelet count and thrombocytosis in gynecologic malignancies. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;295(1):9-15.
158. Maráz A, Furák J, Varga Z, Kahán Z, Tiszlavicz L, Hideghéty K. Thrombocytosis has a negative prognostic value in lung cancer. *Anticancer Res*. 2013;33(4):1725-9.
159. Foerster B, Moschini M, Abufaraj M, Soria F, Gust KM, Rouprêt M, et al. Predictive and Prognostic Value of Preoperative Thrombocytosis in Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(6):e1039-e45.
160. Gu D, Szallasi A. Thrombocytosis Portends Adverse Prognosis in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of 5,619 Patients in 16 Individual Studies. *Anticancer Res*. 2017;37(9):4717-26.
161. Kwon HC, Kim SH, Oh SY, Lee S, Lee JH, Choi HJ, et al. Clinical significance of preoperative neutrophil-lymphocyte versus platelet-lymphocyte ratio in patients with operable colorectal cancer. *Biomarkers*. 2012;17(3):216-22.
162. Belluco C, Forlin M, Delrio P, Rega D, Degiuli M, Sofia S, et al. Elevated platelet count is a negative predictive and prognostic marker

- in locally advanced rectal cancer undergoing neoadjuvant chemoradiation: a retrospective multi-institutional study on 965 patients. *BMC Cancer*. 2018;18(1):1094.
163. Kim TG, Park W, Kim H, Choi DH, Park HC, Kim SH, et al. Baseline neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio in rectal cancer patients following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Tumori*. 2019;105(5):434-40.
164. Dudani S, Marginean H, Tang PA, Monzon JG, Raissouni S, Asmis TR, et al. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as predictive and prognostic markers in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiation. *BMC Cancer*. 2019;19(1):664.
165. Li ZM, Huang JJ, Xia Y, Sun J, Huang Y, Wang Y, et al. Blood lymphocyte-to-monocyte ratio identifies high-risk patients in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *PLoS One*. 2012;7(7):e41658.
166. Stotz M, Pichler M, Absenger G, Szkandera J, Armingier F, Schaberl-Moser R, et al. The preoperative lymphocyte to monocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage III colon cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(2):435-40.
167. Yamamoto A, Toiyama Y, Okugawa Y, Oki S, Ide S, Saigusa S, et al. Clinical Implications of Pretreatment: Lymphocyte-to-Monocyte Ratio in Patients With Rectal Cancer Receiving Preoperative Chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum*. 2019;62(2):171-80.
168. Chan JC, Chan DL, Diakos CI, Engel A, Pavlakis N, Gill A, et al. The Lymphocyte-to-Monocyte Ratio is a Superior Predictor of Overall Survival in Comparison to Established Biomarkers of Resectable Colorectal Cancer. *Ann Surg*. 2017;265(3):539-46.

-
169. Li A, He K, Guo D, Liu C, Wang D, Mu X, et al. Pretreatment blood biomarkers predict pathologic responses to neo-CRT in patients with locally advanced rectal cancer. *Future Oncol.* 2019;15(28):3233-42.
170. Amin MB, American Joint Committee on Cancer., American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual. Eight edition / editor-in-chief, Mahul B. Amin, MD, FCAP ; editors, Stephen B. Edge, MD, FACS and 16 others ; Donna M. Gress, RHIT, CTR - Technical editor ; Laura R. Meyer, CAPM - Managing editor.* ed. Chicago IL: American Joint Committee on Cancer, Springer; 2017. xvii, 1024 pages p.
171. Borrmann R. Makroskopische Formen des vorgeschrittenen Magenkrebses. In: Henke F, Lubarsch O (eds) *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie.*; Vol. 4/1, Springer, Berlin.
172. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30(9):1299-311.
173. Kakar S SC, Berho ME, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinoma of the colon and rectum. Illinois: College of American Pathologists. 2017;version 4.0.0.0.
174. Ryan R, Gibbons D, Hyland JM, Treanor D, White A, Mulcahy HE, et al. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *Histopathology.* 2005;47(2):141-6.
175. Kim BH, Kim JM, Kang GH, Chang HJ, Kang DW, Kim JH, et al. Standardized Pathology Report for Colorectal Cancer, 2nd Edition. *J Pathol Transl Med.* 2020;54(1):1-19.
176. Hosmer D, Lemeshow S. *Applied logistic regression, Chapter 5.* 2nd ed. New York, NY: John Wiley and Sons; 2000. 160 - 4 p.

177. Guillem JG, Diaz-Gonzalez JA, Minsky BD, Valentini V, Jeong SY, Rodriguez-Bigas MA, et al. cT3N0 rectal cancer: potential overtreatment with preoperative chemoradiotherapy is warranted. *J Clin Oncol.* 2008;26(3):368-73.
178. Giglia MD, Stein SL. Overlooked Long-Term Complications of Colorectal Surgery. *Clin Colon Rectal Surg.* 2019;32(3):204-11.
179. Guren MG, Eriksen MT, Wiig JN, Carlsen E, Nesbakken A, Sigurdsson HK, et al. Quality of life and functional outcome following anterior or abdominoperineal resection for rectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2005;31(7):735-42.
180. Braun LH, Baumann D, Zwirner K, Eipper E, Hauth F, Peter A, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Rectal Cancer-Novel Biomarker of Tumor Immunogenicity During Radiotherapy or Confounding Variable? *Int J Mol Sci.* 2019;20(10).
181. Ren DL, Li J, Yu HC, Peng SY, Lin WD, Wang XL, et al. Nomograms for predicting pathological response to neoadjuvant treatments in patients with rectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2019;25(1):118-37.
182. Hamid HKS, Davis GN, Trejo-Avila M, Igwe PO, Garcia-Marín A. Prognostic and predictive value of neutrophil-to-lymphocyte ratio after curative rectal cancer resection: A systematic review and meta-analysis. *Surg Oncol.* 2021;37:101556.
183. Hodek M, Sirák I, Ferko A, Örhalmi J, Hovorková E, Hadži Nikolov D, et al. Neoadjuvant chemoradiotherapy of rectal carcinoma : Baseline hematologic parameters influencing outcomes. *Strahlenther Onkol.* 2016;192(9):632-40.
184. Nagasaki T, Akiyoshi T, Fujimoto Y, Konishi T, Nagayama S, Fukunaga Y, et al. Prognostic Impact of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Patients with Advanced Low Rectal Cancer Treated with Preoperative Chemoradiotherapy. *Dig Surg.* 2015;32(6):496-503.

185. Shen J, Zhu Y, Wu W, Zhang L, Ju H, Fan Y, et al. Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Locally Advanced Rectal Cancer Treated with Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Med Sci Monit.* 2017;23:315-24.
186. Zhang Y, Liu X, Xu M, Chen K, Li S, Guan G. Prognostic value of pretreatment systemic inflammatory markers in patients with locally advanced rectal cancer following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Sci Rep.* 2020;10(1):8017.
187. Ward WH, Goel N, Ruth KJ, Esposito AC, Lambreton F, Sigurdson ER, et al. Predictive Value of Leukocyte- and Platelet-Derived Ratios in Rectal Adenocarcinoma. *J Surg Res.* 2018;232:275-82.
188. Jeon BH, Shin US, Moon SM, Choi JI, Kim MS, Kim KH, et al. Neutrophil to Lymphocyte Ratio: A Predictive Marker for Treatment Outcomes in Patients With Rectal Cancer Who Underwent Neoadjuvant Chemoradiation Followed by Surgery. *Ann Coloproctol.* 2019;35(2):100-6.
189. Xu N, Li W, Huang F, Yang J, Wen Z, Yin L, et al. Systemic inflammation-based predictors of pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *J Cancer Res Ther.* 2022;18(2):438-44.
190. Shi X, Zhao M, Shi B, Chen G, Yao H, Chen J, et al. Pretreatment blood biomarkers combined with magnetic resonance imaging predict responses to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Front Oncol.* 2022;12:916840.
191. Wang J, Zhang F, Jiang F, Hu L, Chen J, Wang Y. Distribution and reference interval establishment of neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR), and platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) in Chinese healthy adults. *J Clin Lab Anal.* 2021;35(9):e23935.

192. Azab B, Camacho-Rivera M, Taioli E. Average values and racial differences of neutrophil lymphocyte ratio among a nationally representative sample of United States subjects. *PLoS One*. 2014;9(11):e112361.
193. Huguet E, Maccallini G, Pardini P, Hidalgo M, Obregon S, Botto F, et al. Reference Values for Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR), a Biomarker of Cardiovascular Risk, According to Age and Sex in a Latin American Population. *Curr Probl Cardiol*. 2021;46(3):100422.
194. Associação Médica Brasileira. Classificação Brasileira Hierarquizada de Procedimentos Médicos (CBHPM). [Internet]. 2022;[acesso em 7 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://amb.org.br/cbhpm>.
195. Runau F, Collins A, Fenech GA, Ford E, Dimitriou N, Chaudhri S, et al. A single institution's long-term follow-up of patients with pathological complete response in locally advanced rectal adenocarcinoma following neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 2017;32(3):341-8.
196. Jakubowska K, Koda M, Kisielewski W, Kanczuga-Koda L, Grudzinska M, Famulski W. Pre- and postoperative neutrophil and lymphocyte count and neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*. 2020;13(5):56.
197. Wen S, Chen N, Peng J, Ling W, Fang Q, Yin SF, et al. Peripheral monocyte counts predict the clinical outcome for patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2019;31(11):1313-21.
198. Naschitz JE, Yeshurun D, Eldar S, Lev LM. Diagnosis of cancer-associated vascular disorders. *Cancer*. 1996;77(9):1759-67.
199. Toiyama Y, Inoue Y, Kawamura M, Kawamoto A, Okugawa Y, Hiro J, et al. Elevated platelet count as predictor of recurrence in rectal cancer patients undergoing preoperative chemoradiotherapy followed by surgery. *Int Surg*. 2015;100(2):199-207.

-
200. Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, Iwasaki Y, Kubota K. Preoperative thrombocytosis is associated with survival after surgery for colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2012;106(7):887-91.
 201. Kawai K, Kitayama J, Tsuno NH, Sunami E, Watanabe T. Thrombocytosis before pre-operative chemoradiotherapy predicts poor response and shorter local recurrence-free survival in rectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2013;28(4):527-35.
 202. Kitayama J, Yasuda K, Kawai K, Sunami E, Nagawa H. Circulating lymphocyte number has a positive association with tumor response in neoadjuvant chemoradiotherapy for advanced rectal cancer. *Radiat Oncol*. 2010;5:47.
 203. Kitayama J, Yasuda K, Kawai K, Sunami E, Nagawa H. Circulating lymphocyte is an important determinant of the effectiveness of preoperative radiotherapy in advanced rectal cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:64.
 204. Rimini M, Franco P, Bertolini F, Berardino B, Giulia ZM, Stefano V, et al. The Prognostic Role of Baseline Eosinophils in HPV-Related Cancers: a Multi-institutional Analysis of Anal SCC and OPC Patients Treated with Radical CT-RT. *J Gastrointest Cancer*. 2022:1-10.
 205. Petrie HT, Klassen LW, Kay HD. Inhibition of human cytotoxic T lymphocyte activity in vitro by autologous peripheral blood granulocytes. *J Immunol*. 1985;134(1):230-4.
 206. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol*. 1986;39(6):585-9.
 207. Park YA, Sohn SK, Seong J, Baik SH, Lee KY, Kim NK, et al. Serum CEA as a predictor for the response to preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Surg Oncol*. 2006;93(2):145-50.
 208. Tsai PL, Su WJ, Leung WH, Lai CT, Liu CK. Neutrophil-lymphocyte ratio and CEA level as prognostic and predictive factors in colorectal

- cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(2):582-9.
209. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2009;124(10):2406-15.
210. Moskal A, Norat T, Ferrari P, Riboli E. Alcohol intake and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer.* 2007;120(3):664-71.
211. Restivo A, Cocco IM, Casula G, Scintu F, Cabras F, Scartozzi M, et al. Aspirin as a neoadjuvant agent during preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Br J Cancer.* 2015;113(8):1133-9.
212. Morris ZS, Saha S, Magnuson WJ, Morris BA, Borkenhagen JF, Ching A, et al. Increased tumor response to neoadjuvant therapy among rectal cancer patients taking angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers. *Cancer.* 2016;122(16):2487-95.
213. Zhang ZJ, Zheng ZJ, Kan H, Song Y, Cui W, Zhao G, et al. Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2011;34(10):2323-8.
214. Han J, Kim JH, Lee JW, Han SH, Kim H. Neoadjuvant therapy of metformin is associated with good tumor response after preoperative concurrent chemoradiotherapy for rectal cancer. *Sci Rep.* 2022;12(1):3716.