



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

MARCELO DO REGO MACIEL SOUTO MAIOR

**Avaliação Histológica dos Brotamentos
Peritumorais no Câncer Colorretal**

**RECIFE
2017**

MARCELO DO REGO MACIEL SOUTO MAIOR

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS BROTAMENTOS
PERITUMORAIS NO CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello
Programa de Pós-graduação em Patologia, CCS/UFPE
Departamento de Patologia, CCS/UFPE

Coorientadora:

Prof. Dra. Mariana Montenegro de Melo Lira
Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas, UFPE
Departamento de Patologia, CCS/UFPE

RECIFE
2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M227a Maior, Marcelo do Rego Maciel Souto.
 Avaliação histológica dos brotamentos peritumorais no câncer
 colorretal / Marcelo do Rego Maciel Souto Maior. – 2017.
 80 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientador: Roberto José Vieira de Mello.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.

 Inclui referências e anexos.

 1. Neoplasias colorretais. 2. Patologia. 3. Prognóstico. I. Mello,
 Roberto José Vieira de (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-188)

MARCELO DO REGO MACIEL SOUTO MAIOR

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS BROTAMENTOS PERITUMORAIS NO CÂNCER
COLORRETAL. DISSERTAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Aprovada em: 25/08/2017

Banca Examinadora:

Examinador Interno: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Programa de Pós-graduação em Patologia, CCS/UFPE
Departamento de Patologia, CCS-UFPE

Examinador Interno: Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior

Departamento de Patologia, CCS/UFPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Examinador Externo: Prof. Dra. Norma Thomé Jucá

Departamento de Patologia, CCS-UFPE

RECIFE
2017

À minha esposa, **Katarina L. Vasconcelos**
Souto Maior, mulher extraordinária.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, com quem aprendi, através do exemplo, o valor da honestidade e do conhecimento.

Aos meus filhos, por quem sinto um amor que não pode ser expresso com palavras.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello, cuja dedicação profissional inspirou a mim e a meus colegas de especialidade.

À minha Coorientadora, Prof. Dra. Mariana Lira, pela participação decisiva na minha formação como patologista.

Aos meus colegas de turma do mestrado, com quem dividi momentos de aprendizado e descontração e a quem desejo muito sucesso.

À minha amiga, revisora e coorientadora extraoficial, Ana Paula Fernandes, cujo brilho como cientista e professora será certamente notável.

A todos aqueles que fazem parte do Mestrado em Patologia, que muito contribuíram para a consecução do meu projeto.

Aos pacientes que fizeram parte da minha pesquisa, minha mais sincera gratidão.

Ao meu analista, João Alberto Carvalho, que nos bastidores não me deixou desanimar.

Aos amigos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas.

“We shall never surrender”

Sir Winston Churchill

RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias malignas com maior incidência e mortalidade no mundo. Uma das medidas mais importantes na busca de maiores índices de cura encontra-se no estudo dos fatores prognósticos através da análise histopatológica. Os brotamentos peritumorais, alvos de numerosas pesquisas nos últimos anos, são um biomarcador histológico associado a piores desfechos. Contudo, para sua avaliação e implementação na rotina diagnóstica ainda se faz necessário validar e padronizar um método de quantificação e gradação. No presente trabalho, avaliamos os brotamentos propondo-nos a medir estatisticamente sua associação com fatores prognósticos do CCR e validar a técnica de Ueno modificada. De forma retrospectiva, obtivemos espécimes cirúrgicos de 92 colectomias por CCR realizadas no HC-UFPE entre 2005 e 2016 e utilizamos o método de Ueno modificado para avaliar os brotamentos, por ser a técnica mais reproduzida nos grandes estudos. Os espécimes foram classificados em alto e baixo grau, com posterior cálculo da associação entre os brotamentos e outros fatores prognósticos. Semelhantemente às grandes publicações, encontramos associação positiva, estatisticamente significativa, entre os brotamentos de alto grau e as (metástases linfonodais) ($p= 0,023$), a (invasão angiolinfática) ($p< 0,001$) e (perineural) ($p< 0,001$), a (borda tumoral do tipo infiltrativa) ($p< 0,001$) e os (depósitos tumorais no tecido adiposo mesocólico) ($p= 0,005$). Concluímos que os brotamentos em alto grau estão de fato associados a outros biomarcadores prognósticos e que a técnica de Ueno modificada é factível, custo-efetiva e capaz de quantificar os brotamentos com precisão.

Palavras-chave: Neoplasias Colorretais. Patologia. Prognóstico.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is one of the commonest malignant neoplasms worldwide, with high mortality rates. One of the most important measures to attain better cure rates is the evaluation of tumoral prognostic factors through histopathological analysis. "Tumor buddings", a histological biomarker extensively studied in the last years, have proved to be associated with worse outcomes. Nevertheless, for its evaluation and implementation in the diagnostic routine, it is still necessary to validate and standardize a method for its quantification and graduation. In this study, we analyzed tumor buddings aiming to statistically measure its association with prognostic factors in CRC and validate Ueno's modified technique. Retrospectively, we obtained 92 surgical colectomy specimens with CRC performed at HC-UFPE between 2005 and 2016 and used Ueno's modified method to evaluate the buddings, because It has been broadly reproduced in large studies. The specimens were classified either as high or low grade and their association with other prognostic factors was assessed. In accordance with most large publications, we found a positive, statistically significant association between high grade tumor buddings and (lymph node metastasis) ($p= 0,023$), (lymphovascular invasion) ($p< 0,001$), (perineural invasion) ($p< 0,001$), (infiltrative configuration of the tumor border) ($p< 0,001$) and (tumoral deposits in the mesocolic fat tissue) ($p= 0,005$). In conclusion, high grade tumor budding is indeed associated to other histological biomarkers and Ueno's modified technique is feasible, cost-effective and capable of quantifying buddings with precision.

Keywords: Colorectal Neoplasms. Pathology. Prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência de Câncer Colorretal no Brasil	17
Figura 2	Mortalidade por Câncer Colorretal no Brasil	18
Figura 3	Adenocarcinoma Usual	20
Figura 4	Adenocarcinoma Mucinoso	20
Figura 5	Brotamentos Peritumorais na Interface Tumor-Estroma em Adenocarcinoma Usual	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação Histológica do Carcinoma Colorretal (WHO, 2010)	21
Tabela 2	Classificação TNM para o Câncer Colorretal (AJCC, 2017)	24
Tabela 3	Métodos de Avaliação dos Brotamentos (Adaptado de MITROVIC et al., 2012)	36
Tabela 4	Frequências Absolutas e Percentuais para Cada uma das Variáveis Categóricas e Medidas Descritivas para as Variáveis Numéricas	56
Tabela 5	Frequências Absolutas dos Brotamentos Peritumorais e Medidas de Associação entre os BPTs e outras Variáveis Categóricas	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC *American Joint Committee on Cancer*
APC *Adenomatous Polyposis Coli*
CCR Câncer colorretal
CGA Campo de Grande Aumento
CpG Citosina - fosfoguanina
CRC Colorectal Cancer
EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*
HE Hematoxilina/Eosina
HMGA2 High Motility Group AT- hook 2
IC Instabilidade Cromossômica
IHC Imunoistoquímica
IMS Instabilidade de Microssatélites
INCA Instituto Nacional do Câncer
ITBCC *International Tumor Budding Consensus Conference*
KRAS *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
OMS Organização Mundial de Saúde
WHO World Health Organization
TEM Transição Epitelial-Mesenquimal
TGF Transforming Growth Factor
Tis Tumor *in situ*
TNM *Tumor, Nodes, Metastasis*
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 EPIDEMIOLOGIA	17
2.2 PATOGÊNESE	18
2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS HISTOLÓGICOS	19
2.4 ESTADIAMENTO PATOLÓGICO	22
2.5 FATORES PROGNÓSTICOS ADICIONAIS	24
2.5.1 Graduação Histológica	25
2.5.2 Subtipo Histológico	26
2.5.3 Margem Radial	26
2.5.4 Invasão Vascular Sanguínea e Linfática	26
2.5.5 Infiltração Perineural	26
2.5.6 Depósitos Tumorais no Tecido Pericólico	27
2.5.7 Resposta Imune do Hospedeiro	27
2.5.8 Borda Invasiva do Tumor	28
2.5.9 Resposta à Terapia Neoadjuvante	28
2.5.10 Brotamentos Peritumorais (BPT)	28
2.6 BROTAMENTOS PERITUMORAIS (BPT)	29
2.6.1 Características Gerais	29
2.6.2 Comportamento Biológico, Aspectos Biomoleculares e Genéticos	30
2.6.3 Características da Interface Tumor-Estroma	31
2.6.4 Achados Morfológicos	32
2.6.5 Significado Clínico dos Brotamentos	33
2.6.5.1 <i>BPTs nos Carcinomas Colorretais Precoces</i>	33
2.6.5.2 <i>BPTs nos Carcinomas Colorretais Estágio II (T3-4 N0)</i>	34
2.6.5.3 <i>BPTs nos Carcinomas Colorretais Estágio III</i>	35
2.6.5.4 <i>BPTs nos Carcinomas Colorretais Metastáticos</i>	35
2.6.5.5 <i>BPTs nos Carcinomas Colorretais com Instabilidade de Microssatélites</i>	35
2.6.6 Sistemas de Avaliação dos Brotamentos	35
2.6.6.1 <i>Populações Estudadas</i>	38

2.6.6.2 Definição de Brotamentos	38
2.6.6.3 Coloração Hematoxilina/Eosina (HE) versus Imunoistoquímica (IHQ)	39
2.6.6.4 Graduação de Brotamentos	39
2.6.6.5 Concordância Interobservador	41
2.6.6.6 Método de Ueno Original versus Método de Ueno Modificado	41
2.6.6.7 International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC).....	43
3 JUTIFICATIVA	46
4 OBJETIVOS.....	47
4.1 OBJETIVO GERAL	47
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5 METODOLOGIA	48
5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	48
5.2 CENÁRIO DA PESQUISA.....	48
5.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E PERÍODO DE REFERÊNCIA	48
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	48
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	49
5.6 AMOSTRAS	49
5.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO BROTAMENTOS E OUTROS PARÂMETROS	49
5.8 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DOS BROTAMENTOS	50
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	51
6 RESULTADOS.....	52
6.1 ARTIGO.....	52
7 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	79
ANEXO B – ATIVIDADES DESENVOLVENDO DURANTE O MESTRADO (2015- 2017).....	80

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna epitelial que se origina a partir da mucosa do intestino grosso. É um dos tumores malignos mais comuns do mundo, sendo a terceira causa de morte relacionada ao câncer no ocidente (SIEGEL et al., 2017).

Sua patogênese é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, sendo a idade avançada o principal fator de risco (AMERICANCANCERSOCIETY, 2017). O CCR é tipicamente assintomático nos estágios precoces. Já os tumores avançados têm maior probabilidade de provocar sinais e sintomas característicos, especialmente quando são localizados à esquerda: alterações no hábito intestinal, constipação, hematoquesia, distensão abdominal e tenesmo (nos tumores retais). Os tumores do cólon direito, por sua vez, causam sinais menos específicos, como fadiga, perda ponderal e anemia ferropriva (WOOD, 2014). Apenas 40% dos pacientes apresentam tumores restritos ao cólon no momento do diagnóstico. Aproximadamente 40% têm metástases regionais e cerca de 20% a distância (RODRIGUES COY, 2013).

Histologicamente, os carcinomas colorretais são representados por diversos subtipos, dos quais o mais comum é o adenocarcinoma usual, que corresponde a 75-80% dos casos (LANZA et al., 2011).

O diagnóstico dos CCRs pode ser feito precocemente apenas nos casos em que os pacientes são submetidos a exames de rastreio, como colonoscopias, sigmoidoscopias e pesquisa de sangue oculto nas fezes. Na maioria das vezes, os pacientes apresentam alguns dos sintomas citados no momento do diagnóstico devido ao crescimento da neoplasia. O procedimento mais utilizado para confirmação diagnóstica do CCR é a colonoscopia com biópsia. Para avaliar a profundidade da invasão e a disseminação regional e a distância, são utilizadas técnicas como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética, ultrassonografia endoscópica pré-operatórias (FREEMAN, 2013).

A maior parte dos pacientes são submetidos a colectomias, e a análise histológica dos espécimes cirúrgicos fornece dados adicionais sobre o estadiamento locorregional da doença (AMIN et al., 2017; COMPTON, 2006; WHASHINGTON et al., 2009). Desta forma, a redução da mortalidade depende consideravelmente da avaliação histopatológica dos produtos de colectomias, o que permite identificar os

fatores prognósticos e utilizá-los para guiar a conduta médica subsequente e estratificar os pacientes quanto ao risco de metástases, desfecho da doença e mortalidade (BOSCH et al., 2013; CUNNINGHAM et al., 2010; SAGAERT, 2014).

Dentre os aspectos prognósticos, a extensão anatômica do tumor pelo estadiamento TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) é o mais importante parâmetro para o CCR (DUKES, 1980; MOU et al., 2013; SAGAERT, 2014). No entanto, diversos outros biomarcadores histológicos são associados a piores desfechos e por isso são considerados pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* como fatores prognósticos adicionais (MAGUIRE, 2014; WADA et al., 2015; AMIN et al., 2017).

Um destes biomarcadores histológicos, os brotamentos peritumorais (BPT), são definidos como células isoladas ou em pequenos grupos que se destacam na periferia da massa tumoral principal em direção ao estroma adjacente (LUGLI; KARAMITOPOULOU; ZLOBEC, 2012; LUGLI et al., 2017; MITROVIC et al., 2012; YAMADA et al., 2017). *São células pouco diferenciadas, possivelmente correspondendo a uma alteração biológica conhecida como transição epitelial-mesênquimal, conferindo maior capacidade de invasão e disseminação* (KEVANS et al., 2011; KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016; THIERY et al., 2009).

Existem atualmente muitas evidências científicas de que os BPT tenham valor prognóstico independente, comprovadamente associados a metástases e redução da sobrevida (LUGLI et al., 2017). Portanto, sua avaliação tem o potencial de influenciar na decisão terapêutica. A falta de padronização e validação das diferentes técnicas de avaliação dos brotamentos têm dificultado sua introdução na rotina diagnóstica dos patologistas. Em maio de 2017, a Conferência para o Consenso Internacional sobre os Brotamentos (*International Tumor Budding Consensus Conference - ITBCC*) (LUGLI et al., 2017), realizada em Berna, Suíça, definiu diretrizes sobre as definições e padronizações das técnicas de avaliação dos brotamentos e sua incorporação na rotina diagnóstica. Contudo, devido ao fato de os grandes estudos sobre os brotamentos serem ainda muito recentes, ainda é necessária investigação adicional sobre o tema, com diferentes metodologias, para maior validação e padronização.

A técnica de Ueno et al modificada (LUGLI et al., 2017; MITROVIC et al., 2012; UENO et al., 2002) vem sendo a mais utilizada nos grandes trabalhos, sendo um método simples, prático e de baixo custo, que utiliza apenas lâminas coradas com HE e apresenta boa concordância interobservador, sendo o método escolhido

pelo referido consenso. Define um brotamento como células isoladas ou em grupos de até 4 células que se destacam da borda invasiva do tumor. A contagem desses brotamentos em um campo de 0,785 mm² classifica os tumores como alto grau (10 ou mais brotamentos/campo). Em numerosos trabalhos que utilizaram esta técnica, foi verificada associação estatisticamente significativa entre os brotamentos em alto grau e os outros fatores de mau prognóstico, além de menor sobrevida em 5 anos. (LUGLI et al., 2009, 2017).

Não identificamos, em nossa revisão bibliográfica, estudos no Brasil que tenham como objetivo validar métodos para a avaliação dos BPTs e caracterizar o valor prognóstico deste biomarcador histológico, sendo este o intuito do presente trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

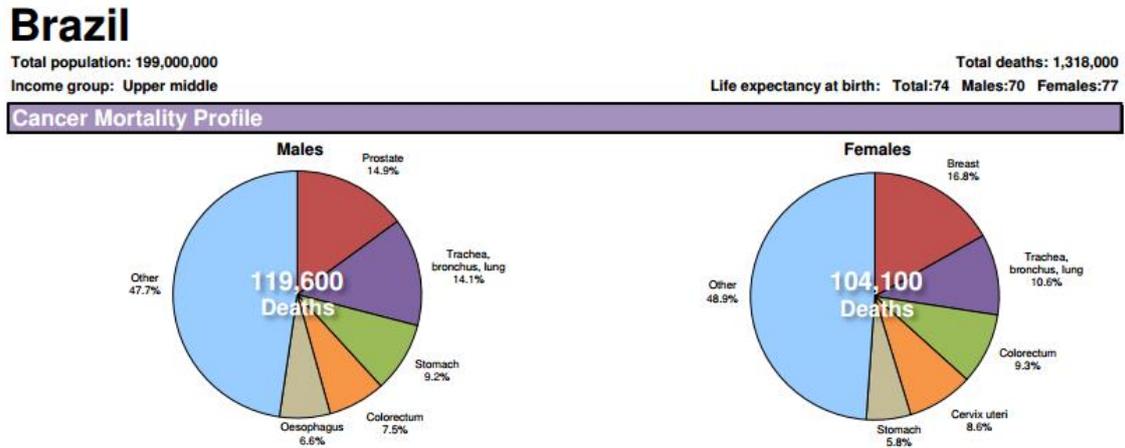
O Câncer colorretal (CCR) continua sendo uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer no mundo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (AMERICANCANCERSOCIETY, 2017; SAGAERT, 2014; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). É o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado em homens (após os tumores de próstata e pulmão) e o segundo entre as mulheres, atrás apenas do câncer de mama (figura 1) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Anualmente, o CCR é responsável por 9% de todas as mortes por câncer no ocidente e representa a quarta e terceira causa de morte por câncer entre mulheres e homens, respectivamente (figura 2) (DIENSTMANN et al., 2017). No Brasil, a estimativa de novos casos de CCR para 2016 era de 34.280, sendo 16.660 homens e 17.629 mulheres (INCA, 2016). Em 2013, o número de óbitos pela doença em nosso país foi 15.415 (INCA, 2014).

Figura 1 – Incidência de Câncer Colorretal no Brasil

	Localização primária	casos novos	%	
Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%	
	Cólon e Reto	17.530	6,4%	
	Colo do Útero	15.590	5,7%	
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%	
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%	
	Estômago	7.520	2,7%	
	Corpo do Útero	5.900	2,2%	
	Ovário	5.680	2,1%	
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%	
	Leucemias	4.320	1,6%	
	Localização primária	casos novos	%	
	Próstata	68.800	22,8%	Homens
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	
	Cólon e Reto	15.070	5,0%	
	Estômago	12.870	4,3%	
	Cavidade Oral	11.280	3,7%	
	Esôfago	8.010	2,6%	
	Laringe	6.870	2,3%	
	Bexiga	6.750	2,2%	
	Leucemias	5.050	1,7%	
	Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	

Fonte: INCA, 2014.

Figura 2 – Mortalidade por Câncer Colorretal no Brasil



Fonte: OMS, 2014.

2.2 PATOGÊNESE

A etiopatogênese do CCR é multifatorial, envolvendo aspectos genéticos e ambientais (DE LA CHAPELLE, 2004; WOOD, 2014). São tumores que surgem na maior parte das vezes em pacientes acima de 50 anos e são na maioria das vezes esporádicos, originados quase sempre a partir de lesões epiteliais benignas precursoras: os pólipos adenomatosos, que costumam preceder o câncer por um período médio de 15 anos (CAMPBELL, 1999; FREEMAN, 2013; JASS, 2002).

Adenomas residuais são identificados em aproximadamente 10% a 30% dos espécimes de colectomias por CCR. A prevalência dos adenomas é alta, chegando a mais de 50% em idosos com mais de 70 anos. (FREEMAN, 2013; STRYKER et al., 1987). As mutações genéticas podem ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumor. Esse processo é crucial na transformação dos adenomas em CCRs (DE LA CHAPELLE, 2004).

Há três formas principais de vias moleculares que podem levar ao surgimento dos CCRs: a instabilidade cromossômica (IC), a instabilidade de microssatélites (IMS) e o Fenótipo Metilador de Ilhas CpG (citosina-fosfoguanina) (GUINNEY et al., 2015). Os principais genes envolvidos na carcinogênese da IC são o protooncogene KRAS, o P53 e o APC (supressores de tumor). Este é o tipo mais frequente de instabilidade genômica no CCR, presente em 80-85% dos casos (KANTHAN; SENGER; KANTHAN, 2012).

Na IMS, presente em aproximadamente 15% dos CCRs, há alterações disseminadas no tamanho de sequências repetidas de DNA (microssatélites). O mecanismo causador desta alteração é a deficiência no sistema de reparo do DNA, quando ocorrem erros na sua replicação durante a fase S do ciclo celular. (KOELZER et al., 2015a).

Quanto ao Fenótipo Metilador de Ilhas CpG, este é um tipo de instabilidade epigenética, causando metilações em regiões específicas do DNA ricas em CpG, com subsequente inativação de genes supressores de tumor por silenciamento genético (O'BRIEN; ZHAO; YANG, 2015).

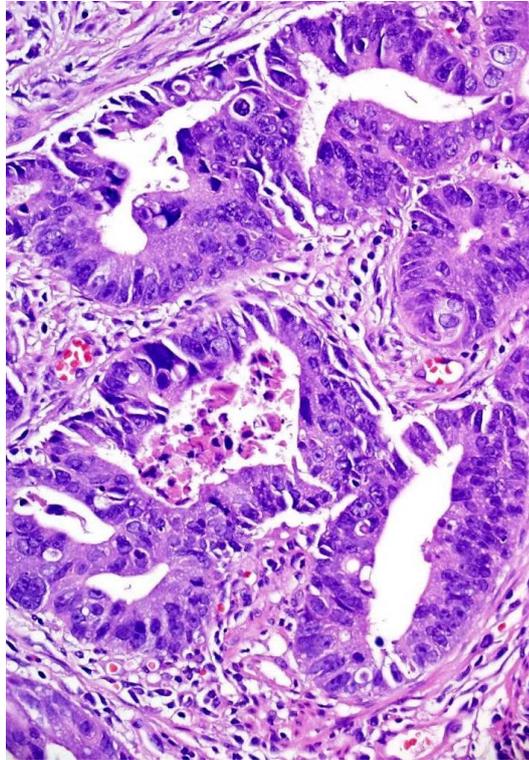
Existem alguns fatores de risco ambientais que, apesar de terem pouco impacto isoladamente, são importantes por serem modificáveis (PONZ DE LEON et al., 2004). A dieta pobre em fibras, rica em alimentos condimentados e carnes estão relacionadas a maior incidência da doença. Quanto aos hábitos de vida, citamos o sedentarismo e a obesidade. (RODRIGUES COY, 2013).

Nas síndromes genéticas hereditárias, como a Polipose Adenomatosa Familiar e as Síndromes de Lynch I e II (cânceres colorretais hereditários não associados a poliposes), a incidência de CCRs é dezenas de vezes superior aos casos esporádicos, sendo os tumores geralmente múltiplos, surgindo em pacientes mais jovens, com parentes de primeiro grau também acometidos (PONZ DE LEON et al., 2004; WOOD, 2014). No entanto, por serem raras, estas síndromes são responsáveis por menos de 5% do total dos carcinomas diagnosticados (DE LA CHAPELLE, 2004; PONZ DE LEON et al., 2004).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS HISTOLÓGICOS

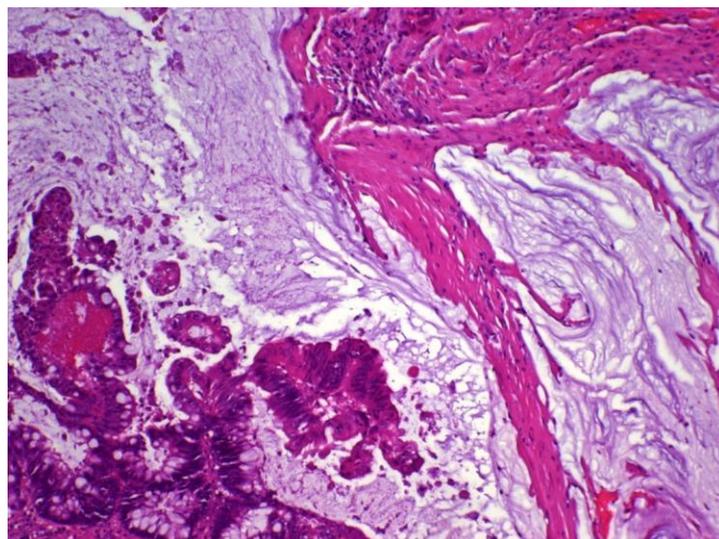
Histologicamente, os carcinomas colorretais são representados por diversos subtipos, dos quais o mais comum é o adenocarcinoma usual (figura 3), que corresponde a 75-80% dos casos (LANZA et al., 2011). O carcinoma mucinoso é o tipo diagnosticado em 10% dos casos (figura 4) (LAM; CHAN; LEUNG, 2014; LANGNER et al., 2012). Já o carcinoma de células em anel de sinete responde por 2% do total. Dentre os subtipos mais raros, que isoladamente representam menos de 1% de todos os carcinomas colorretais, citam-se o carcinoma medular e o adenoescamoso (LANZA et al., 2011). A tabela 1 mostra a classificação dos tipos histológicos de acordo com a OMS (CANCER, 2010).

Figura 3 – Adenocarcinoma Usual



Fonte: Arquivos do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas-UFPE.

Figura 4 – Adenocarcinoma Mucinoso



Fonte: Arquivos do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas-UFPE.

Tabela 1 – Classificação Histológica do Carcinoma Colorretal

Tipo Histológico	Frequência aproximada (%)
Adenocarcinoma usual	75-80
Adenocarcinoma mucinoso	8-10
Carcinoma de células em “anel de sinete”	2
Carcinoma medular	1.0
Carcinoma adenoescamoso	<1.0
Carcinoma escamoso	<1.0
Carcinoma de pequenas células (neuroendócrino)	<1.0
Carcinoma indiferenciado	<1.0
Tumor misto adenocarcinoma/ carcinoide	<1.0
Carcinoma micropapilífero	<1.0
Carcinoma cribriforme	<1.0
Carcinoma fusocelular	<1.0

Fonte: WHO, 2010.

Macroscopicamente, os adenocarcinomas usuais costumam ser sólidos, infiltrativos, com configurações variadas, podendo ser polipoides, difusos ou constrictivos. À microscopia, são tumores caracterizados pela formação de estruturas glandulares, com graus variáveis de diferenciação (BARRESI et al). Nos carcinomas bem ou moderadamente diferenciados, há glândulas distintas, com células atípicas e arquitetura complexa, que infiltram a parede intestinal. Pode haver mitoses abundantes, necrose e reação desmoplásica. As neoplasias mal diferenciadas são constituídas por células atípicas menos coesas, em arranjo difuso sólido ou em cordões. As porções mais profundas dos adenocarcinomas usuais, que formam a frente invasiva, podem apresentar brotamentos peritumorais (LANZA et al., 2011).

De acordo com OMS, os carcinomas em que 50% ou mais da massa tumoral corresponde a mucina extracelular são chamados de mucinosos. São tumores que

tendem a se apresentar em estágios mais avançados no momento do diagnóstico e representam grande parte das neoplasias localizadas no cólon direito. Macroscopicamente, sua superfície de corte é gelatinosa, com pouco tecido fibroso, o que confere ao tumor um aspecto colóide (CUNNINGHAM et al., 2010). À microscopia, os adenocarcinomas mucinosos são compostos de estruturas glandulares ou células tumorais embebidas em lagos de mucina (LANGNER et al., 2012). Na interface tumor-estroma, podemos observar brotamentos apenas nos tumores que possuem algum componente glandular, mas não naqueles formados apenas por mucina. Existem ainda os adenocarcinomas usuais com componentes mucinosos, nos quais a proporção de mucina pode estar entre 10% e 50% (BARRESI et al., 2015; LANGNER et al., 2012).

2.4 ESTADIAMENTO PATOLÓGICO

Como vimos, o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes consiste na colectomia, ou seja, ressecção cirúrgica do segmento intestinal comprometido pela neoplasia. O estadiamento “TNM”(AMIN et al., 2017; EDGE; COMPTON, 2010; KOELZER et al., 2015a; NIZZE; BARTEN; PRALL, 2005), continua sendo o parâmetro mais importante obtido na análise histopatológica, pois avalia a extensão da disseminação do CCR.

A inicial “T” refere-se à profundidade de invasão tumoral local, ou seja, na parede do intestino; “N” designa a presença de metástases para linfonodos regionais e “M” indica metástases a distância (IHNÁT et al., 2014; RESCH; LANGNER, 2013).

Estas informações costumam guiar a conduta médica no pós-operatório e estratificar os pacientes quanto ao prognóstico. A extensão anatômica do tumor (TNM) é estratificada como se segue (AMIN et al., 2017):

PROFUNDIDADE DA INVASÃO TUMORAL (estadiamento T):

Tx: tumor primário não avaliável.

T0: sem evidências de tumor.

Tis: tumores *in situ* (confinados à camada mucosa).

T1: invasão até a camada submucosa.

T2: invasão até a muscular própria.

T3: invasão até a subserosa.

T4a: invasão através da subserosa com perfuração do peritônio visceral.

T4b: invasão de estruturas adjacentes por contiguidade.

METÁSTASES LINFONODAIS (estadiamento N)

Nx: linfonodos regionais não avaliáveis.

N0: ausência de metástases linfonodais.

N1a: metástase em 1 linfonodo regional.

N1b: metástase em 2 ou 3 linfonodos regionais.

N1c: depósitos tumorais isolados na gordura pericólica, sem evidências de metástases linfonodais (vide item “Depósitos Tumorais na Gordura Pericólica”).

N2a: metástases em 4 a 6 linfonodos regionais.

N2b: metástases em 7 ou mais linfonodos regionais.

N (mic): micrometástases linfonodais (aquelas que medem entre 0,2mm e 2mm).

Lesões menores que 0,2mm são denominadas “células tumorais isoladas” e são classificadas como N0.

É importante que sejam obtidos no mínimo 12 linfonodos regionais à dissecação da gordura pericólica para adequado estadiamento (WASHINGTON et al., 2009).

METÁSTASES A DISTÂNCIA (estadiamento M)

M0: ausência de metástases a distância.

Mx: metástases a distância não avaliáveis.

M1a: metástase para 1 órgão ou grupo de linfonodos não regionais sem metástases peritoneais.

M1b: Metástases para mais de um órgão ou grupo de linfonodos não regionais, sem metástases peritoneais.

M1c: metástases peritoneais com ou sem metástases em outros órgãos.

A extensão anatômica do tumor (TNM) define o estágio em que se encontram os pacientes com CCR, da seguinte forma (tabela 2):

Tabela 2 – Classificação TNM para o Câncer Colorretal

Estágios	T	N	M
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio I	T1-2	N0	M0
Estágio II A	T3	N0	M0
Estágio II B	T4a	N0	M0
Estágio II C	T4b	N0	M0
EstágoIII A	T1-2	N1/N1c	M0
	Ou T1	N2a	M0
EstágoIII B	T3-T4a	N1/N1c	M0
	Ou T2-T3	N2a	M0
	Ou T1-T2	N2b	M0
EstágoIII C	T4a	N2a	M0
	Ou T3-T4a	N2b	M0
	Ou T4b	N1-N2	M0
Estágio IVA	Qualquer T	Qualquer N	M1a
Estágio IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1b
Estágio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1c

Fonte: AJCC, 2017.

2.5 FATORES PROGNÓSTICOS ADICIONAIS

De acordo com o AJCC, além do estadiamento TNM, é de fundamental importância refinar a estratificação prognóstica através da identificação dos biomarcadores histológicos (fatores prognósticos) adicionais (AMIN et al., 2017). Eles auxiliam na avaliação do comportamento biológico dos tumores, sua agressividade, probabilidade de recorrência e metastatização, invasividade e probabilidade de resposta terapêutica (SAGAERT, 2014). Nas duas últimas décadas, muito se tem pesquisado sobre os biomarcadores prognósticos, alguns dos quais já foram consistentemente validados e são inquestionavelmente preditores dos desfechos no CCR (BOLOCAN et al., 2012; ROGERS et al., 2014; TATEISHI et al., 2010).

Todos os fatores prognósticos histológicos devem ser avaliados na rotina anatomopatológica independentemente do estadiamento, para individualizar o máximo possível o comportamento biológico dos tumores (JONKER; SPITHOFF; MAROUN, 2011; KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016; RESCH; LANGNER, 2013). Contudo, a principal importância dos biomarcadores histológicos reside justamente nos casos em que a conduta seria controversa ou variável com base apenas no TNM (LENNON et al., 2003; SINICROPE et al., 2014). Nos casos cujo estadiamento seja T3-4 N0 M0 (estádio II), por exemplo, os biomarcadores de mau prognóstico podem estratificar com mais precisão os casos de alto risco e indicar quimioterapia adjuvante (HORCIC et al., 2013a; NIZZE; BARTEN; PRALL, 2005). Outra situação são os tumores precoces pelo TNM (T1 N0 M0), mas que apresentam biomarcadores histológicos de agressividade, podendo motivar colectomias ao invés da simples ressecção endoscópica (LUGLI et al., 2017; TANAKA et al., 2015).

Os biomarcadores histológicos que já mostraram valor prognóstico independente são: o grau de diferenciação tumoral (graduação histológica); o subtipo histológico; o *status* da margem circunferencial (radial); a invasão neoplásica vascular sanguínea e linfática; infiltração perineural; depósitos tumorais isolados na gordura mesocólica; resposta imune do hospedeiro (infiltrado linfocitário peritumoral); configuração da borda invasiva tumoral; resposta à terapia neoadjuvante e, mais recentemente, o grau dos brotamentos peritumorais (DAWSON et al., 2015; LUGLI et al., 2017; SAGAERT, 2014).

2.5.1 Graduação Histológica

É um parâmetro prognóstico já estabelecido, sendo rotineiramente reportado nos laudos anatomopatológicos. Baseia-se na proporção do tumor que é composta por glândulas, em comparação com a porção composta de áreas sólidas ou com cordões e ninhos de células sem lúmen. De acordo com a última classificação da OMS, as neoplasias podem ser classificadas como bem diferenciadas (mais de 95% na massa tumoral composta por formações glandulares), moderadamente diferenciadas (50% a 95% de formações glandulares), mal diferenciadas (entre 5% e 50% de formações glandulares) e indiferenciadas (<5% de formações glandulares). Atualmente, outros autores recomendam que a graduação histológica seja bimodal, ou seja, os tumores são classificados como de baixo grau (englobando os antigos bem e moderadamente diferenciados), ou de alto grau (pouco diferenciados e

indiferenciados), pois o uso do sistema bimodal garante menos subjetividade e melhor reprodutibilidade interobservador (BARRESI et al., 2015; SAGAERT, 2014). A graduação tumoral somente se aplica ao adenocarcinomas usuais. Por definição, os carcinomas de células em anel de sinete e de pequenas células são sempre de alto grau. Alguns autores consideram o mesmo para os tumores mucinosos. (BARRESI et al., 2015; REGGIANI BONETTI et al., 2016). Os tumores menos diferenciados são um fator independente de mau prognóstico (SAGAERT, 2014).

2.5.2 Subtipo Histológico

Tem-se observado uma menor sobrevida dependendo dos subtipos histológicos, quando comparados com os carcinomas usuais. Isto acontece nos tumores mucinosos, nos carcinomas de células em anel de sinete e nos carcinomas indiferenciados (YIU; YIU, 2016).

2.5.3 Margem Radial

O envolvimento da margem circunferencial (radial) pode explicar a recorrência local da neoplasia em muitos pacientes, pois denota a presença de células tumorais residuais na cavidade peritoneal. (GRAHAM et al., 2015; NAGTEGAAL et al., 2002).

2.5.4 Invasão Vascular Sanguínea e Linfática

A embolização tumoral para vasos linfáticos e veias deve ser cuidadosamente pesquisada e reportada nos laudos. É definida como a presença de células tumorais dentro de espaços revestidos por endotélio, correspondendo a fases iniciais da metastatização. Além dos êmbolos, a perfuração da parede venosa além da camada muscular é um fator independente de mau prognóstico, segundo estudos, indicando aumento do risco de recorrência e piora da sobrevida (GIGER et al., 2012; REGGIANI BONETTI et al., 2016).

2.5.5 Infiltração Perineural

A infiltração neoplásica perineural deve ser reportada como presente ou ausente em todos os laudos da rotina diagnóstica. Este achado correlaciona-se com maiores taxas de recorrência local da neoplasia, diminuição da sobrevida e aumento da probabilidade de metástases no momento da ressecção cirúrgica (GALVÁN et al., 2015). A invasão perineural pode ser facilmente detectada nos exames histológicos

de rotina pela coloração Hematoxilina/ Eosina, correspondendo a células neoplásicas aderidas ou aprisionando nervos nas proximidades do carcinoma (SCHNEIDER; LANGNER, 2014).

2.5.6 Depósitos Tumorais no Tecido Pericólico

Em alguns casos, a análise das peças cirúrgicas revela depósitos tumorais no tecido adiposo pericólico, sem que se identifique estrutura residual de linfonodo. A interpretação desses achados tem sido problemática, e várias definições são usadas nas diferentes edições do *AJCC Cancer Staging Manual*. De acordo com a última edição, essas alterações são definidas como depósitos tumorais irregulares, isolados da massa tumoral principal, localizados na gordura mesocólica, sem evidências de linfonodo residual (AMIN et al., 2017). Pelo fato dessas lesões serem associadas a pior prognóstico, sua presença é classificada no estadiamento N como N1c, e a quantidade desses nódulos deve ser citada no laudo. (LO et al., 2008; RESCH; LANGNER, 2013).

2.5.7 Resposta Imune do Hospedeiro

Este achado traduz uma reação do sistema imune à proliferação tumoral, representada por um infiltrado linfocitário intra-tumoral e peritumoral, além dos agregados linfoides peritumorais, que podem conter ou não centros germinativos. De maneira geral, quanto mais denso for o infiltrado linfocitário de qualquer tipo, melhor o prognóstico (KOELZER et al., 2015a). A graduação do infiltrado linfocitário peritumoral é feita em 3 níveis: 1- ausência de infiltrado ou infiltrado discreto; 2- leve/moderado (linfócitos esparsos/ agregados ocasionais); 3- acentuado (agregados linfoides abundantes, alguns com centros germinativos). (VÄYRYNEN et al., 2013). Nos últimos anos, os linfócitos peritumorais vêm ganhando notoriedade devido à sua associação com os CCR que contêm deficiências no reparo do DNA (instabilidade de microssatélites), particularmente quando se observam quantidades significativas de linfócitos infiltrando o epitélio tumoral. (KANTHAN; SENGER; KANTHAN, 2012). Os linfócitos intraepiteliais também têm mostrado associação inversa com a invasão venosa, os brotamentos peritumorais e outros achados de mau prognóstico. Também têm mostrado valor independente como marcador de bom prognóstico. Apesar do entusiasmo quanto a este marcador histológico, espera-se ainda por um

sistema de graduação simples, reprodutível e com validação suficiente para o seu uso na prática (DE SMEDT; PALMANS; SAGAERT, 2016).

2.5.8 Borda Invasiva do Tumor

A borda invasiva tumoral do CCR, assim como em outros tipos de câncer, apresenta variações histológicas. Microscopicamente, há tumores que exibem bordas predominantemente expansivas, regulares, de contornos precisos, aparentando deslocar o tecido estromal adjacente. Por outro lado, os tumores com borda infiltrativa são irregulares e dissecam o estroma. À macroscopia, os primeiros são bem delimitados e os últimos têm contornos imprecisos (COMPTON, 2006; ISHIKAWA et al., 2008; STEINESTEL et al., 2014). Nos anos 1980, estudos apontaram que estas características opostas da borda tumoral influenciam no prognóstico. Os critérios de classificação propostos foram baseados no aspecto macroscópico e histológico destas neoplasias. Constatou-se que os tumores infiltrativos têm valor prognóstico negativo independente (JASS et al., 1996; STEINESTEL et al., 2014; UENO et al., 2015).

2.5.9 Resposta à Terapia Neoadjuvante

Estudos realizados na década de 1990 mostraram que a radio e quimioterapia pré-operatórias para tumores retais ocasionavam redução da massa tumoral, muitas vezes reduzindo o estadiamento local e possibilitando melhor ressecção cirúrgica da lesão remanescente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017;).

Desta forma, a terapia neoadjuvante passou a ser o tratamento de escolha para tumores retais com estadiamento pré-operatório T3 e T4 ou que apresentam metástases linfonodais. A resposta tumoral ao tratamento neoadjuvante é variada, podendo ser de mínima a significativa. Neste último grupo, a massa neoplásica é quase ou completamente extinta, restando apenas fibrose, lagos de mucina, macrófagos espumosos, hemossiderófagos, alterações epiteliais reativas e ulceração ao exame da peça cirúrgica (MORODOMI et al., 1989).

O prognóstico e a sobrevida em cinco anos são melhores quanto maior for a resposta terapêutica (COMPTON, 2006; WHASHINGTON et al., 2009).

2.5.10 Brotamentos Peritumorais (BPT)

Existem atualmente muitas evidências científicas de que os BPTs tenham valor prognóstico independente, portanto sua avaliação tem o potencial de

influenciar na decisão terapêutica (HASE et al., 1993; DE SMEDT et al., 2017; LUGLI et al., 2017; UENO et al., 2002). Maior detalhamento deste fator prognóstico será fornecido nos tópicos subsequentes.

2.6 BROTAMENTOS PERITUMORAIS (BPT)

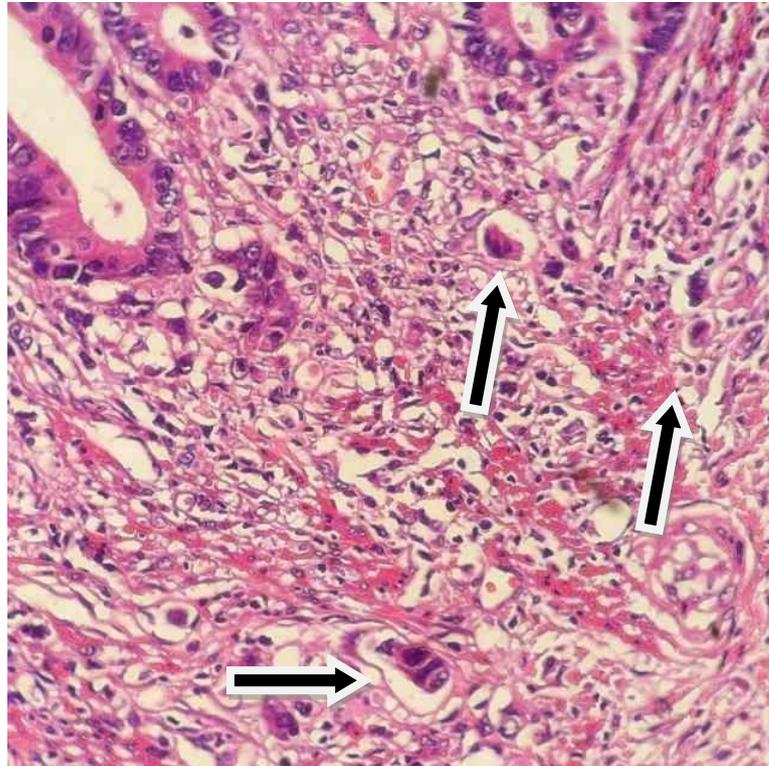
2.6.1 Características gerais

BPTs são definidos como células tumorais isoladas ou em pequenos grupos, pouco diferenciadas, que se destacam da massa tumoral principal em direção ao estroma adjacente na borda invasiva da neoplasia (figura 5). (HASE et al., 1993; UENO et al., 2002)(KOELZER et al., 2015b). Representam uma etapa precoce de disseminação da doença, conferindo aos tumores maior agressividade e capacidade de metastatização. Têm sido evidenciados em carcinomas de vários sítios primários, como mama, pâncreas, esôfago e estômago, sendo no entanto mais extensamente estudados nos tumores colorretais (ALMANGUSH et al., 2016; CONNOR et al., 2015).

Apesar dos brotamentos peritumorais terem se destacado na literatura apenas na década passada, eles foram descritos pela primeira vez em 1954 por Imai (IMAI, 1954), que postulou que os brotamentos significariam maior velocidade de crescimento da neoplasia.

A maior parte dos CCRs usuais apresenta brotamentos em alguma quantidade, quando examinados minuciosamente. Por isso, o ponto mais importante é a identificação do que seriam os níveis de brotamentos classificados como alto grau, ou seja, quantidades suficientes de brotamentos para causar impacto negativo no prognóstico.

Figura 5 – Brotamentos Peritumorais na Interface Tumor-Estroma em Adenocarcinoma Usual



Fonte: Arquivos do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas-UFPE.

2.6.2 Comportamento Biológico, Aspectos Biomoleculares e Genéticos

A explicação biológica para os brotamentos não é inteiramente compreendida, mas a principal teoria vigente é a da transição epitelial-mesenquimal (TEM), um processo que pode significar a etapa inicial de disseminação e metastatização dos tumores (GALVÁN et al., 2015; WARTENBERG et al., 2015).

A TEM se caracteriza por modificações genômicas e proteômicas que culminam na desdiferenciação das células neoplásicas, tornando-as menos coesas, com maior motilidade e maior capacidade de disseminação. São, portanto, distintas das células que compõem o tumor principal (JOLLY et al., 2016). A identificação de vias de sinalização específicas que levam à TEM é importante, pois além de explicar a formação e o comportamento biológico dos brotamentos, pode ainda servir de base para o desenvolvimento de novos tratamentos direcionados a inibir as alterações moleculares iniciais envolvidas nesse processo (DAWSON et al., 2015).

O complexo E-caderina/ Beta catenina localizado na membrana citoplasmática é crucial para a adesão entre as células e a manutenção da polaridade celular. Na formação dos brotamentos, ocorre ativação constitutiva da via de sinalização WNT, caracterizada pela perda da molécula de adesão E-caderina da membrana citoplasmática e pela translocação da beta-catenina para o núcleo da célula, onde ela funciona como um fator de transcrição oncogênico.

Nesta etapa, há ativação de vários genes e produção de moléculas que explicam o comportamento biológico dos BPTs (DE SMEDT et al., 2017; KANTHAN; SENGER; KANTHAN, 2012). Como exemplos destas alterações, podemos citar: a ativação do AKT, que confere resistência das células dos brotamentos à apoptose; aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que estimula a angiogênese nas proximidades dos brotamentos; a síntese de metaloproteinases, com aumento da degradação da matriz extracelular e facilitação da motilidade das células dos brotamentos; expressão do p16, que causa parada do ciclo celular e diminuição da proliferação; aumento do HMGA2 (High-mobility group AT-hook 2), que incrementa a capacidade migratória e invasiva das células; diminuição da expressão do CDX2, com perda da diferenciação (GUINNEY et al., 2015; RODRIGUEZ-SALAS et al., 2017).

Além da via WNT, outras formas de sinalização levam à migração nuclear da beta-catenina e perda da e-caderina incluem a ativação do TGF-beta, a ativação dos receptores com atividade de tirosina-quinase, incluindo o RAS e o RAF (TALBOT; BHATTACHARYA; KUO, 2012).

Essas alterações moleculares moldam os aspectos morfológicos e ultraestruturais dos brotamentos, como será visto adiante (DE SMEDT et al., 2017; JOLLY et al., 2016).

2.6.3 Características da Interface Tumor-Estroma

A interação dos brotamentos com o tecido adjacente também possui peculiaridades. A natureza do estroma peritumoral é um possível fator prognóstico, sendo o tipo mixoide associado a pior desfecho, quando comparado às reações desmoplásicas mais densas e maduras (UENO et al., 2015).

Muitos trabalhos têm mostrado o valor independente do infiltrado linfocitário na região da interface tumor-estroma (LUGLI et al., 2009; WARTENBERG et al., 2015). Koelzer et al. demonstraram que uma reação linfocitária proeminente local

está associada a melhor prognóstico quando há brotamentos, sugerindo que uma resposta imune pode estar sendo dirigida a eles (KOELZER et al., 2015a).

Em pacientes com acentuado infiltrado de linfócitos T citotóxicos (CD8), os brotamentos são raramente encontrados. Tem sido postulado que esses linfócitos sejam capazes de destruir os BPTs (JASS et al., 1996; LUGLI et al., 2009, 2017). Essas alterações moleculares podem ser alvos de terapias antitumorais mais direcionadas e eficientes para conter a disseminação tumoral pelos brotamentos. (BRONSERT et al., 2014).

Há uma forte associação entre os brotamentos e a invasão angiolinfática na interface tumor-estroma. Sugere-se que os BPTs sejam exatamente aquelas células do tumor que adquiriram a capacidade de invadir tais vasos. Para confirmar essa hipótese, dois estudos morfológicos foram importantes: Morodomi (MORODOMI et al., 1989) demonstrou, por meio de cortes seriados, que os brotamentos em alto grau são frequentemente encontrados em áreas adjacente às invasões de vasos linfáticos. Em outro estudo, Ohtsuki et al realizaram IHQ com dupla marcação para citoqueratinas e anticorpos contra vasos linfáticos, mostrando que muitos brotamentos nas proximidades da borda tumoral na verdade estavam dentro destes pequenos vasos (OHTSUKI et al., 2008).

Semelhantemente, os brotamentos têm mostrado associação com metástases a distância, por meio de invasão vascular sanguínea prévia na borda invasiva dos tumores, como mostram outros trabalhos (DE SMEDT; PALMANS; SAGAERT, 2016; SALHIA et al., 2015)

2.6.4 Achados Morfológicos

Como visto, a desdiferenciação das células tumorais causadas pela TEM, levam ao destacamento de células menos diferenciadas, pouco coesas, a partir da borda tumoral em direção ao estroma.

A primeira descrição morfológica detalhada foi realizada por Gabbert e colaboradores (GABBERT et al., 1985), que utilizaram microscopia óptica e eletrônica para caracterizar o limite invasivo dos CCRs. Eles identificaram um subgrupo de carcinomas cuja arquitetura tumoral era claramente diferente na borda invasiva em relação ao centro da massa neoplásica, esta última apresentando glândulas bem formadas, que passavam a emitir células isoladas ou em pequenos

grupos, pouco diferenciadas, conforme o tumor chegava à sua margem invasiva (ROGERS et al., 2016).

Quando analisados em cortes histológicos únicos, os brotamentos parecem completamente destacados do tumor principal. No entanto, Prall e colaboradores, utilizando anticorpos anti-pancitoqueratina, demonstraram, após cortes seriados, que os brotamentos são na realidade conectados a glândulas adjacentes maiores por prolongamentos citoplasmáticos, como se estivessem brotando (PRALL, 2007). Por isso, o termo “brotamentos” foi criado por Morodomi et al (MORODOMI et al., 1989). Especula-se que tais prolongamentos contribuam para a movimentação celular dos brotamentos através do estroma.

À microscopia óptica, os brotamentos são grupos celulares pouco diferenciados, sem formar lúmens glandulares, não devendo ser confundidos com fragmentação artificial do tumor principal. No menor aumento, os brotamentos são vistos como pequenos grupos celulares na borda invasiva, causando irregularidades na interface tumor-estroma. No maior aumento, é possível a individualização dos brotamentos como células isoladas ou em pequenos grupos indiferenciados (HASE et al., 1993b; KOELZER et al., 2015a; UENO et al., 2004).

À microscopia eletrônica, essas células apresentam pouca diferenciação, núcleos grandes, ausência de complexos juncionais, desmossomos e membrana basal (DAWSON; LUGLI, 2015).

2.6.5 Significado Clínico dos Brotamentos

Os brotamentos têm repetidamente mostrado um valor prognóstico adverso independente, estando associados a metástases linfonodais e a distância, pior sobrevida total, pior sobrevida livre de doença e maior recorrência local (NANDITA et al., 2016; ROGERS et al., 2014; STEINESTEL et al., 2014). Estão ainda associados a outros fatores histológicos de mau prognóstico no CCR, tais como o alto grau histológico, a borda tumoral de padrão infiltrativo, a presença de invasão vascular linfática e sanguínea e a invasão perineural (CAIE et al., 2014).

O impacto prognóstico adverso dos brotamentos em alto grau é observado tanto em tumores precoces quanto avançados e há diversos cenários nos quais este marcador pode influenciar nas decisões terapêuticas.

2.6.5.1 BPTs nos Carcinomas Colorretais Precoces

No carcinoma colorretal precoce, com invasão até a camada submucosa (T1), os tumores costumam ter excelente desfecho e baixas taxas de metástases para linfonodos, sendo muitas vezes tratados por ressecção endoscópica (MACIAS-GARCIA et al., 2015; WANG et al., 2009; YAMAUCHI, 2008).

No estudo com maior casuística envolvendo tumores precoces, Ueno et al. demonstrou que os brotamentos em alto grau, a invasão vascular linfática e o alto grau histológico são fatores independentes associados a metástases linfáticas (UENO et al., 2004). Em pacientes que não possuíram nenhum destes fatores de risco, a taxa de metástases linfonodais foi menor que 1%, sugerindo que a mucosectomia endoscópica pode ser suficiente como tratamento para esses pacientes, se a margem de ressecção estiver livre de neoplasia. Já nos pólipos malignos precoces com brotamentos em alto grau a probabilidade de metástases linfonodais subiu para cerca de 15-20% (UENO et al., 2004).

Por este motivo, a identificação histológica de marcadores de risco poderia indicar colectomia ao invés da ressecção endoscópica, mais conservadora (TANAKA et al., 2015).

2.6.5.2 BPTs nos Carcinomas Colorretais Estágio II (T3–4 N0)

Pacientes no estágio II do câncer colorretal têm desfechos muito variados e neste subgrupo os brotamentos poderiam ser úteis na estratificação de risco.

Em alguns trabalhos, a presença dos brotamentos em alto grau piorou consideravelmente a sobrevida, tornando-a até mesmo equivalente à dos pacientes no estágio III (JONKER; SPITHOFF; MAROUN, 2011; NIZZE; BARTEN; PRALL, 2005; TANAKA et al., 2003). Atualmente, as indicações para quimioterapia no estágio II são incertas, sendo reservadas para os casos que apresentem marcadores de alto risco, como alto grau histológico, estadiamento pT4 e invasão venosa extramural (JONKER; SPITHOFF; MAROUN, 2011; KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016; MITROVIC et al., 2012). O impacto negativo que os brotamentos de alto grau têm mostrado motivou uma série de autores a defender o uso da quimioterapia adjuvante na sua presença (BRENNER; KLOOR; POX, 2014; KÖHNE, 2006).

No seu estudo envolvendo pacientes em estágios II e III, Okuyama et al. identificou que os BPTs foram o único fator em análise multivariada a ser associado

a pior sobrevida, sendo mais importante até mesmo do que as metástases linfonodais para o prognóstico (OKUYAMA; NAKAMURA; YAMAGUCHI, 2003).

2.6.5.3 BPTs nos Carcinomas Colorretais Estágio III

Estudos envolvendo casos com estágio III (T1-4 N+) são mais escassos e o valor dos brotamentos neste grupo é menos claro (DERWINGER; CARLSSON; GUSTAVSSON, 2008; SINICROPE et al., 2014).

Choi et al estudaram brotamentos tumorais em 103 pacientes no estágio III e encontraram um valor prognóstico independente (CHOI et al., 2015). Por outro lado, na série de Sy et al, com 477 casos de CCR estágio III (SY et al., 2010), embora tenha ocorrido uma diferença de sobrevida entre os casos de alto e baixo grau para brotamentos, este não foi um fator independente para o prognóstico em análise multivariada (ROGERS et al., 2016).

2.6.5.4 BPTs nos Carcinomas Colorretais Metastáticos

Em tumores metastáticos, apenas um grande estudo demonstrou pior resposta à terapia com cetuximab (anticorpo contra o receptor do fator de crescimento epitelial- EGFR) em pacientes com brotamentos em alto grau (DAWSON et al., 2014; ZLOBEC et al., 2013). Apesar de ser necessária confirmação em outros trabalhos, este biomarcador poderia ser utilizado juntamente com o KRAS para predizer os casos não responsivos ao cetuximab (DAWSON et al., 2015).

2.6.5.5 BPTs nos Carcinomas Colorretais com Instabilidade de Microssatélites

Parece haver uma forte correlação negativa entre os brotamentos e os tumores com instabilidade de microssatélites (MLECNIK et al., 2016; WOOD, 2014). Alguns estudos mostraram uma frequência de aproximadamente 50% de brotamentos em neoplasias estáveis para microssatélites, contra uma virtual ausência destes marcadores em tumores instáveis, o que pode, pelo menos em parte, explicar o melhor prognóstico deste último grupo (KOELZER et al., 2015b; LAM; CHAN; LEUNG, 2014;).

2.6.6 Sistemas de Avaliação dos Brotamentos

Apesar de vários estudos terem isoladamente demonstrado o valor prognóstico deste biomarcador, as metodologias para sua avaliação divergem

amplamente. Em 2016, foi realizada a Conferência Internacional para o primeiro Consenso dos Brotamentos Tumoriais (*International Tumor Budding Consensus Conference – ITBCC*) em Berna/Suíça. O principal objetivo do ITBCC foi obter concordância baseada em evidências sobre a padronização da contagem e graduação dos brotamentos, para que este parâmetro seja incluído na rotina dos laudos anatomopatológicos e nos próximos estudos. Os resultados da referida conferência foram publicados em 2017 e serão melhor explicitados adiante (LUGLI et al., 2017).

Apesar das recomendações da conferência, este foi apenas o primeiro consenso sobre o tema e suas conclusões, como afirmam os próprios autores, não são absolutas. Sumarizamos algumas das principais técnicas já desenvolvidas (tabela 3), que serviram de base para as decisões do ITBCC.

Tabela 3 – Métodos de Avaliação dos Brotamentos

Autor- ano	País	População do estudo	Método	Definição de brotamento	Ponto de corte para “alto grau”	Técnica de graduação
Hase 1993	Japão	663 carcinomas colorretais	HE	Não especificado (avaliação subjetiva)	Não há ponto de corte (classificação subjetiva)	Hase
Morodomi 1989	Japão	40 carcinomas retais avançados	HE	Até 5 células	Contagem média em 4 campos de a.25mm ² maior que 14	Morodomi
Jass 1996	Japão	95 carcinomas colorretais	HE	Até 5 células	5 brotamentos em um campo de objetiva de 40x	Jass
Ueno 2002	Japão	638 carcinomas colorretais	HE	< 5 células	10 brotamentos em um campo de objetiva de 25x	Ueno
Ueno 2004	Japão	292 carcinomas colorretais estágio I	HE	< 5 células	5 ou mais brotamentos em um campo de objetiva de 20x	Ueno modificada

Losi 2006	Itália	295 carcinomas colorretais estágio I	Imunoistoquímica	< 5 células	> 5 brotamentos em um campo de objetiva de 20x	Ueno modificada
Ishikawa 2008	Japão	71 carcinomas colorretais com invasão até submucosa	Imunoistoquímica	< 5 células	> 4 brotamentos em um campo de objetiva de 40x	Ishikawa
Yamauchi 2008	Japão	164 carcinomas colorretais T1	Imunoistoquímica	< 5 células	5 brotamentos em um campo de objetiva de 20x	Ueno modificada
Wang 2009	Irlanda	128 carcinomas colorretais pT3 N0	Imunoistoquímica	< 5 células	Contagem em 5 campos de objetiva de 20x. Média de 1 brotamento/campo	Morodomi
Betge 2012	Áustria	110 carcinomas colorretais estágio II	HE	< 5 células	>9 brotamentos/campo de objetiva de 20x	Ueno modificada
Zlobec 2012	Suíça	127 carcinomas colorretais estágios I, II e III	Imunoistoquímica	< 6 células	6 ou mais brotamentos / campo de objetiva de 40x	Zlobec
Marcias 2014	Garcia Espanha	97 carcinomas colorretais estágios I e II	HE	<5 células	10 ou mais brotamentos campo de objetiva de 20x	Ueno modificada
Sert Bectas 2012	Turquia	73 carcinomas colorretais estágios I, II e III	HE	< 5 células	10 ou mais brotamentos/ campo de objetiva de 20x	Ueno modificada
Baresi 2016	Itália	82 carcinomas colorretais	HE	<5 células	4 ou mais focos de brotamentos em campos de objetiva de 20x	Ueno modificada

estágio II						
Myachi 2015	Japão	653 carcinomas colorretais estágio I	HE	< 5 células	4 ou mais focos de brotamentos em campos de objetiva de 20x	Ueno modificada
Horcic 2012	Suíça	297 carcinomas colorretais estágio II	imunoistoquímica	< 5 células	Média de 10 ou mais brotamentos em 10 campos de objetiva de 40x	Horcic

Fonte: adaptado de MITROVIC et al., 2012.

Conforme a tabela, as divergências nos sistemas de avaliação dos brotamentos ocorrem em vários aspectos:

2.6.6.1 Populações Estudadas

Os pesquisadores que desenvolveram técnicas específicas utilizaram populações de estudo diferentes, o que pode causar divergências na avaliação dos brotamentos. Alguns selecionaram casos no estágio I, outros incluíram apenas estágios II e outros ainda não restringiram os casos, usando tumores em vários graus de disseminação (SERT BEKTAŞ et al., 2012). O próprio Ueno, em seu trabalho de 2004, utilizou apenas tumores precoces (pT1), que são quase sempre pequenos e tendem a apresentar menos brotamentos (UENO et al., 2004). Conforme observado na tabela 1, há muitas variações nos estádios tumorais incluídos. Quanto à localização dos tumores, há estudos que incluíram apenas tumores retais, ou colônicos, porém a maioria incluiu neoplasias de toda a extensão colorretal. Numericamente, as populações também são divergentes, variando de 40 casos a 663.

Inicialmente, os estudos envolvendo brotamentos eram concentrados no Japão. Na última década, contudo, houve diversos trabalhos na Europa, EUA e Canadá.

2.6.6.2 Definição de Brotamentos

Em todos os principais trabalhos, os brotamentos peritumorais são definidos como “células tumorais isoladas ou em pequenos grupos”, pouco diferenciadas e que se destacam da periferia do tumor principal em direção ao estroma adjacente (BETGE et al., 2012; HORCIC et al., 2013a; LOSI et al., 2006). As discordâncias ocorrem notadamente no número máximo de células que compõem um brotamento. Nos primeiros grandes estudos, alguns autores não estabeleciam um limite superior (HASE et al., 1993b), porém nos últimos anos tem sido quase unânime o número máximo de 4 células (DE SMEDT; PALMANS; SAGAERT, 2016; LUGLI et al., 2017).

2.6.6.3 Coloração Hematoxilina/ Eosina (HE) versus Imunoistoquímica (IHQ)

A periferia do tumor pode conter numerosas células mesenquimais ativadas, como fibroblastos, células endoteliais e histiócitos, que podem simular células dos brotamentos (PUPPA et al., 2012). Um infiltrado inflamatório intenso e a presença de necrose tumoral também podem dificultar a visualização dos brotamentos. Ainda, glândulas neoplásicas podem se fragmentar durante o processamento, simulando células do brotamento (MITROVIC et al., 2012; MIYACHI et al., 2016). Por fim, brotamentos com células únicas podem passar despercebidos na avaliação microscópica de rotina pelo HE (HORCIC et al., 2013a; SERT BEKTAŞ et al., 2012).

Por estes motivos, alguns autores defendem o uso rotineiro da IHQ com anticorpos anti-pancitoqueratina na avaliação dos brotamentos, pois os anticorpos marcam apenas as células tumorais, realçando os brotamentos menores e destacando-os das células estromais e inflamatórias da interface tumor-estroma (CAIE et al., 2014; SATOH et al., 2014).

A IHQ é dispendiosa e requer mais tempo de preparo quando comparada ao HE (MITROVIC et al., 2012). Além disto, como veremos, não parece haver um aumento significativo na acurácia da quantificação dos brotamentos com IHQ. Por isto, segundo a maioria dos autores, especialmente nos trabalhos mais recentes e de acordo com o ITBCC, a IHQ não deve ser empregada em todos os casos, mas apenas naqueles de difícil interpretação, quais sejam: os casos com muita inflamação ou células mesenquimais ativadas na interface tumor-estroma, muita necrose e fragmentação artefactual do tumor (LUGLI et al., 2017).

2.6.6.4 Graduação dos Brotamentos

Este aspecto é o mais controverso, justificando o atraso na padronização e validação dos brotamentos como biomarcador. Como vimos, a maioria dos CCRs possui brotamentos em quantidades variadas. Entretanto, é importante o estabelecimento de um ponto de corte a partir do qual os tumores teriam maior probabilidade de associação com pior prognóstico (brotamentos em alto grau).

Apenas um dos principais pesquisadores defendeu em seu estudo a graduação subjetiva, em que o examinador deve classificar os brotamentos como alto ou baixo grau de acordo com sua impressão (HASE et al., 1993b). Nos demais trabalhos, especialmente os mais recentes, os autores procuraram estabelecer pontos de corte (números de brotamentos por área microscópica) a partir dos quais o caso seria classificado como alto grau, ou seja, com maior probabilidade estatística de refletir o mau prognóstico (KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016).

Os brotamentos podem ser quantificados em áreas diferentes conforme a lente objetiva usada e o número de campos microscópicos avaliados. Em seu estudo original, Ueno utilizou a lente de 25, que corresponde a uma área de 0.385mm² (UENO et al., 2002). Outros pesquisadores empregaram a lente de grande aumento (objetiva de 40)(PUPPA et al., 2012). A desvantagem do grande aumento é que ele obtém áreas muito pequenas, restringindo a quantidade de brotamentos que podem ser contados e diminuindo a reprodutibilidade interobservador. Já a lente de 25 não é disponível na maior parte das marcas de microscópios.

Por ser mais disponível e obter área maior (0.785mm²), a lente objetiva de 20 tem sido usada na maioria dos estudos recentes (LUGLI et al., 2017).

Com relação à quantidade de campos microscópicos avaliados, a maioria dos autores prefere a contagem em campo único (*hot spot*), onde há maior concentração de brotamentos (UENO et al., 2002; VAN WYK et al., 2015). Alguns métodos recentes defendem uma melhor reprodutibilidade interobservador e acurácia na graduação quando os brotamentos são quantificados em mais de uma área (4 a 10 campos), com posterior contagem média de brotamentos por unidade de área (HORCIC et al., 2013a; KARAMITOPOULOU et al., 2013; PUPPA et al., 2012). Entretanto, isto torna a avaliação rotineira dos brotamentos mais demorada e laboriosa, não se justificando na prática.

Em síntese, a tendência atual é quantificar os brotamentos em campo único (*hot spot*), utilizando-se preferencialmente a lente objetiva de 20, conforme recomendado pelo ITBCC.

Uma vez obtido o número de brotamentos por área, resta definir o ponto de corte para estratificação do grau de brotamentos, Segundo o ITBCC, o alto grau corresponde a um número de 10 ou mais brotamentos por área de 0.785mm² (lente objetiva de 20) (LUGLI et al., 2017; UENO et al., 2002).

O último ponto de discordância no que se refere à graduação encontra-se na estratificação dos graus. O ITBCC, como veremos, gradua os brotamentos em 3 níveis (baixo grau: 0-4 brotamentos/ campo; grau intermediário: 5-9 brotamentos/ campo; alto grau: 10 ou mais brotamentos/ campo). Há estudos cuja graduação é bimodal (alto grau: 10 ou mais brotamentos/ campo e baixo grau: <10 brotamentos/ campo) (SERT BEKTAŞ et al., 2012). Há ainda trabalhos que graduaram os brotamentos em 4 grupos ou de forma contínua (ROGERS et al., 2016).

2.6.6.5 Concordância Interobservador

Como todo parâmetro histológico, a contagem e graduação dos brotamentos têm seu grau de subjetividade, expressa na variabilidade interobservador (índice kappa). Os valores de Kappa podem ser interpretados como se segue: < 0: não existe concordância; 0-0,20: concordância mínima; 0,21-0,40: concordância razoável; 0,41-0,60: concordância moderada; 0,61-0,80: concordância substancial; 0,81-1,0: concordância perfeita (MITROVIC et al., 2012).

Parece haver um discreto aumento do índice kappa nos estudos que utilizam IHQ e que quantificam os brotamentos em campos múltiplos ao invés do *hot spot*. Entretanto, como estas técnicas são mais laboriosas, não parecem justificáveis (MITROVIC et al., 2012).

A graduação bimodal (alto e baixo grau), quando comparada àquelas com maior estratificação, revelou melhores índices de concordância (ROGERS et al., 2016; UENO et al., 2002; WATANABE et al., 2015).

Poucos estudos envolvendo os brotamentos peritumorais no câncer colorretal utilizaram o índice kappa em suas metodologias, e este parâmetro deve motivar novos trabalhos, já que uma boa concordância interobservador é fundamental para a introdução de um método na rotina diagnóstica e em estudos subsequentes (LUGLI; KARAMITOPOULOU; ZLOBEC, 2012; MITROVIC et al., 2012).

2.6.6.6 Método de Ueno Original versus Método de Ueno Modificado

O pesquisador japonês Hideki Ueno, um dos pioneiros no estudo dos brotamentos peritumorais, realizou um grande trabalho retrospectivo envolvendo 638 espécimes cirúrgicos de tumores retais (UENO et al., 2002).

De acordo com a metodologia empregada, um brotamento é definido como uma célula isolada ou em grupos de até 4 células. A quantificação e graduação foram realizadas através da seguinte técnica:

- 1) Avaliação da borda invasiva do tumor (interface tumor-estroma). Nesta etapa, utilizam-se lentes objetivas de 5 e de 10 em busca das áreas mais ricas em brotamentos.
- 2) Na área selecionada (*hot spot*), os brotamentos foram quantificados em uma área correspondente à lente objetiva de 25 (0.385mm²).
- 3) O autor graduou os brotamentos de duas maneiras:
 - quatro categorias: (0-4; 5-9; 10-20; >20 brotamentos por campo).
 - duas categorias: em alto grau (10 ou mais/campo) ou baixo grau (menos de 10/ campo).

Neste trabalho original, não foi medida a reprodutibilidade interobservador, porém o mesmo autor realizou nova graduação dos brotamentos após 2 meses, selecionando aleatoriamente 100 dos 638 casos. Posteriormente, mediu o índice kappa de reprodutibilidade intrabservador.

Os resultados mostraram um índice kappa de 0.646 para a graduação em 4 categorias (concordância substancial). Para 2 categorias, este índice subiu para 0.840 (concordância quase perfeita).

O estudo estatístico mostrou associação entre os graus mais altos de brotamentos e outros fatores de mau prognóstico tanto na graduação em quatro categorias como naquela que utilizou duas. Em sua conclusão, o autor sugere a graduação em apenas 2 categorias, por apresentar melhor concordância (UENO et al., 2002).

Muitos trabalhos posteriormente utilizaram variações do método de Ueno, confirmando sua acurácia e praticidade, tendo a técnica se destacado nos trabalhos mais recentes (BARRESI et al., 2015; MACIAS-GARCIA et al., 2015; SERT BEKTAŞ et al., 2012).

Na maioria dos países ocidentais, a técnica de Ueno foi adaptada para a lente objetiva de 20, que corresponde a uma área de 0.785mm², uma vez que a maior

parte dos microscópios não dispõe da lente de 25. As demais definições originais do método de Ueno original foram mantidas, isto é, um brotamento = 1 a 4 células; alto grau = 10 ou mais brotamentos por campo; baixo grau = menos de 10 brotamentos por campo. (MITROVIC et al., 2012). O método de Ueno modificado foi reproduzido e validado em outros estudos (KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016).

Como será exposto adiante, o ITBCC recomenda o método de Ueno modificado como técnica de escolha, com apenas uma ressalva: o referido consenso classifica os brotamentos em 3 categorias (baixo grau – 0 a 4/ campo; grau intermediário – 5 a 9/ campo; e alto grau – 10 ou mais/campo), ao invés da classificação bimodal (LUGLI et al., 2017).

2.6.6.7 International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC)

As evidências sobre os BPTs como fator de mau prognóstico já são suficientemente robustas, porém, até recentemente, não se dispunha de um sistema unificado para a padronização deste marcador. Após nove sessões, os 22 participantes do ITBCC (patologistas e cirurgiões do Canadá, EUA, Europa e Japão) chegaram a um consenso sobre os principais aspectos a considerados, como se segue:

- Sessão 1: definições dos brotamentos tumorais.
 - Os brotamentos são definidos como células tumorais isoladas ou em grupos de até 4 células.

- Sessão 2: Brotamentos tumorais nos cenários clínicos.
 - Os brotamentos tumorais são preditores independentes de metástases linfonodais em CCRs precoces (estágio T1).
 - Os brotamentos tumorais são preditores independentes de sobrevida em CCRs estágio II.
 - Os brotamentos tumorais são um fator prognóstico adverso em biópsias pré-operatórias no CCR.

- Sessão 3: Graduação dos brotamentos pelo HE e imunoistoquímica.

- Os brotamentos tumorais devem ser avaliados somente pela Hematoxilina/ Eosina (HE), a menos que existam achados histológicos limitantes, como inflamação acentuada peritumoral.
 - A imunistoquímica pode ser aplicada nestes casos com limitações.
- Sessão 4: Brotamentos intratumorais e peritumorais.
- Os brotamentos intratumorais são avaliáveis em biópsias pré-operatórias.
 - O impacto prognóstico dos brotamentos independe de sua localização (BPT ou BIT).
 - Todos os brotamentos devem ser quantificados nos tumores pT1 e estágio II.
- Sessão 5: Quantidade e tamanho dos campos microscópicos para graduação dos brotamentos.
- Os brotamentos em biópsias pré-operatórias e em tumores pT1 são avaliados nos campos de maior concentração (*hot spots*).
 - Nos espécimes cirúrgicos de colectomias, a contagem dos brotamentos pode ser feita como uma média de 10 campos de grande aumento (CGA) ou em *hot spots*.
 - A área de contagem dos brotamentos deve ser de 0.785mm², independentemente do tipo de microscópio usado.
- Sessão 6: Pontos de corte para graduação dos brotamentos.
- Um ponto de corte para brotamentos em alto grau deve ser estabelecido para facilitar a estratificação de risco no CCR.
 - Uma escala contínua de graduação pode ser referida nos laudos para mensuração mais precisa.
 - O método deve ter reprodutibilidade interobservador suficiente.
- Sessão 7: Brotamentos tumorais na rotina.
- Os brotamentos devem ser incluídos nos laudos anatomopatológicos, protocolos e manuais de CCR.

- Os brotamentos devem ser incluídos na próxima classificação TNM como fator prognóstico adicional, tal como ocorre com a infiltração neoplásica angiolinfática, a diferenciação histológica, etc.
 - O grau dos brotamentos tumorais é independente e distinto do grau de diferenciação histológica dos tumores.
- Sessões 8 e 9: Conclusões e recomendações para pesquisas futuras.
- O método de escolha pelo consenso considera um brotamento como célula tumoral isolada ou em grupos de até 4 células.
 - A quantificação deve ser feita em um campo de maior concentração de brotamentos (*hot spot*) correspondente a um a área de 0.785mm²).
 - A graduação dos brotamentos é estratificada em 3 grupos
 - Baixo grau: 0-4 brotamentos/ área.
 - Grau intermediário: 5-9 brotamentos/ área.
 - Alto grau: 10 ou mais brotamentos/ área.

Como perspectiva futura, o consenso não representa um ponto final, mas sim uma base para novos trabalhos prospectivos ou que reproduzam a técnica recomendada para refinar sua validação.

3 JUSTIFICATIVA

Mais de 1.2 milhão de pacientes são diagnosticados com câncer colorretal anualmente no mundo, causando mais de 600 mil óbitos. Sua incidência é particularmente alta nos países ocidentais (SIEGEL et al., 2017). Devido ao aumento da expectativa de vida global e do Brasil, a incidência deste carcinoma vem aumentando (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O estadiamento TNM continua sendo o principal parâmetro prognóstico, estratificando os casos em estágios de I a IV, conforme o grau de disseminação da doença (AMIN et al., 2017). Os biomarcadores avaliados no estudo histopatológico são fatores prognósticos adicionais do CCR, identificando os casos com maior probabilidade de metástases e menor sobrevida (SAGAERT, 2014). Na prática, podem influenciar a conduta médica em algumas instâncias, como na indicação de quimioterapia adjuvante para tumores no estágio II e de colectomias para tumores precoces (BRENNER; KLOOR; POX, 2014).

Os brotamentos peritumorais já demonstraram valor prognóstico independente em múltiplos estudos. Apesar disto, os grandes trabalhos envolvendo este biomarcador histológico são recentes e os métodos para sua avaliação são bastante diversos. Ainda são necessários estudos adicionais para a validação de uma técnica de escolha, sua padronização e incorporação na rotina diagnóstica (KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016).

As publicações sobre este tema já foram amplamente reproduzidos na Europa, Japão e América do Norte. No Brasil, ainda não há trabalhos designados a testar as técnicas de quantificação dos brotamentos, nem a medir sua associação com outros marcadores histológicos de agressividade tumoral e pior prognóstico. Os brotamentos ainda não têm nomenclatura definida em nosso país, não foram universalmente adotados na rotina diagnóstica brasileira nem padronizados em nossos manuais de laudos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar histologicamente os aspectos quantitativos e qualitativos dos brotamentos peritumorais em peças cirúrgicas de pacientes com carcinoma colorretal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Validar a técnica de Ueno modificada para quantificar e graduar os brotamentos peritumorais;
- b) Medir estatisticamente a associação entre os brotamentos e os seguintes biomarcadores histológicos: metástases linfonodais (estadiamento N); invasão neoplásica angiolinfática; invasão neoplásica perineural; grau de diferenciação tumoral; infiltrado linfocitário peritumoral; margem circunferencial; depósitos tumorais na gordura mesocólica; configuração da borda tumoral; tipo histológico; estadiamento T; estadiamento M;
- c) Medir a associação entre os brotamentos e outras variáveis constantes nos laudos, que não são considerados fatores prognósticos: gênero dos pacientes, localização do tumor, tamanho do tumor; configuração macroscópica.

5 METODOLOGIA

5.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo foi do tipo retrospectivo, analítico, transversal, qualiquantitativo, visando a validar a técnica de Ueno modificada e avaliar a associação entre os brotamentos peritumorais e outros marcadores histológicos de mau prognóstico, em peças cirúrgicas de pacientes com carcinoma colorretal.

5.2 CENÁRIO DA PESQUISA

O estudo foi realizado após carta de anuência do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas-UFPE e após submissão à aprovação de comitê de ética em pesquisa. Os blocos de parafina e laudos referentes às peças cirúrgicas foram procedentes do referido departamento. Os recortes dos blocos e colorações foram realizados no laboratório do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE. Por fim, a quantificação dos brotamentos pelo examinador foi feita novamente no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE.

5.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO E PERÍODO DE REFERÊNCIA

O estudo envolveu 92 peças cirúrgicas de colectomias por câncer colorretal, realizadas entre janeiro de 2005 e junho de 2016 no Hospital das Clínicas da Universidade de Pernambuco.

Os blocos de parafina contendo tecido tumoral de cada um dos espécimes cirúrgicos foram retirados dos arquivos do Departamento de Patologia para a confecção de novas lâminas e reavaliação histológica pelo examinador. Acessamos os laudos histopatológicos arquivados para coleta dos dados necessários à pesquisa.

5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Incluimos os casos com: diagnóstico histopatológico confirmado de adenocarcinoma colorretal usual ou variante mucinosa; blocos em boas condições de conservação; laudos contendo informações completas sobre dados clínicos e anatomopatológicos, mínimo de 2 blocos por espécime identificados no exame macroscópico como sendo fragmentos do tumor; peças cirúrgicas com um mínimo de 12 nódulos dissecados.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os casos com: tumores de outros tipos histológicos; carcinomas *in situ* ou intramucosos (pTis); blocos de parafina em condições inadequadas; menos de 2 blocos referentes ao tecido tumoral; falta de informações essenciais nos laudos; histórico de síndromes hereditárias para o CCR.

Os casos em que o número de linfonodos analisados na peça cirúrgica foi menor que 12 foram excluídos para avaliação da variável “metástases linfonodais”, porém foram utilizados para avaliação dos outros parâmetros.

5.6 AMOSTRAS

Inicialmente, selecionamos 189 casos através de busca no livro de registro do laboratório. 48 casos foram excluídos devido ao número de linfonodos mesocólicos dissecados abaixo de 12. Cinco casos correspondiam a tumores de outros tipos histológicos que não sejam adenocarcinoma usual ou mucinoso. Dois casos foram excluídos por serem mucinosos puros e um caso estava associado à síndrome de Lynch. Em outros 27 havia falta de dados nos laudos sobre o estadiamento e outros parâmetros histológicos. Mais 14 casos foram excluídos após o recorte dos blocos, devido às más condições de conservação do tecido ou pela pouca amostragem do tumor, não sendo possível avaliar a interface tumor-estroma. Dos 92 casos remanescentes, constatamos que em 7 deles os nódulos mesocólicos identificados como linfonodos por vezes correspondiam a tecido fibroso ou coágulos. O número de linfonodos destes 7 casos revelou-se menor que 12. Optamos pela exclusão destes 7 casos para análises estatísticas das metástases linfonodais, mas os mantivemos para avaliação de outros parâmetros histológicos independentes.

As amostras finais consistiram de 2 a 5 blocos de parafina por espécime de colectomia, totalizando 344 blocos. Eles foram recortados, com subsequente processamento e coloração pela Hematoxilina e Eosina.

Os laudos e fichas de requisição anexas forneceram informações sobre as variáveis clínicas, macroscópicas e histológicas.

5.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO BROTAMENTOS E OUTROS PARÂMETROS

Os brotamentos peritumorais são um parâmetro histológico apenas recentemente estudados e não estavam descritos em nenhum dos laudos

selecionados do arquivo. O examinador, em todos os casos, quantificou e graduou os brotamentos pela técnica de Ueno modificada. Além disso, reavaliou os outros parâmetros histológicos intrínsecos dos tumores, como a invasão angiolinfática, invasão perineural, diferenciação tumoral, configuração da borda da lesão, infiltrado linfocitário peritumoral, presença de depósitos tumorais no tecido adiposo pericólico e tipo histológico. Além destes itens, todos os demais parâmetros contidos nos laudos foram catalogados.

5.8 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DOS BROTAMENTOS

O examinador analisou os 92 casos restantes após os critérios de exclusão, quantificando os brotamentos.

O método escolhido para a avaliação dos brotamentos foi o de Ueno modificado. De acordo com esta técnica, o examinador deve primeiramente localizar na lâmina a borda invasiva do tumor, ou seja, a interface tumor-estroma. Para tanto se utiliza a lente objetiva de 5. Ao percorrer tal borda, é possível identificar as áreas mais ricas em brotamentos. No campo selecionado (*hot spot*), a lente objetiva foi então modificada para a de 20, cujo campo ($0,750\text{mm}^2$) foi usado para a contagem dos brotamentos.

Dez ou mais brotamentos em uma área de $0,785\text{mm}^2$ classificam os tumores como alto grau. Os casos com 9 ou menos brotamentos por área foram classificados como baixo grau. Ao final, confrontamos a graduação dos brotamentos com as outras variáveis para análise estatística.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o SPSS versão 20. Inicialmente, executou-se uma análise descritiva para verificar as frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e as medidas de posição e dispersão para as variáveis numéricas. Com esta análise foi possível identificar o perfil dos pacientes presentes na amostra, bem como possíveis tendências nos dados.

Para testar a significância das possíveis associações entre a graduação dos brotamentos tumorais e os demais marcadores, construíram-se tabelas de contingência para verificar os percentuais e em seguida foi utilizado o teste *Qui-Quadrado de Independência* e o *Teste Exato de Fisher* que testam a hipótese nula

de que não existe associação significativa contra a hipótese alternativa de que essas duas variáveis estão associadas. A regra de decisão destes testes se baseia no p-valor, de forma que se o $p\text{-valor} < 0,05$ conclui-se que existe associação significativa entre as variáveis.

Para mensuração de intensidade das associações significativas, fez-se uso do coeficiente V de Cramér. Para todos os testes estatísticos foi adotado o nível de 5% de significância.

5.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A pesquisa utilizou blocos de parafina e laudos correspondentes e requisições anexas, todos arquivados no serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE, assegurando-se absoluto sigilo quanto à identidade dos pacientes. Foi obtida a Carta de anuência do Hospital das Clínicas. O projeto foi posteriormente submetido à Plataforma Brasil e ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFPE, sendo aprovado (CAAE: 50968115.9.0000.5208) - Anexo.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO

Avaliação histopatológica dos brotamentos peritumorais no câncer colorretal

Histopathological evaluation of tumor budding in colorectal cancer

Artigo a ser submetido a revista XXXX

Qualis CAPES:

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the commonest malignant neoplasms worldwide, with high mortality rates. One of the most important measures to attain better cure rates is the evaluation of tumoral prognostic factors through histopathological analysis. "Tumor buddings", a histological biomarker extensively studied in the last years, have proved to be associated with worse outcomes. In this study, we analyzed tumor buddings aiming to statistically measure its association with prognostic factors in CRC and validate Ueno's modified technique. Retrospectively, we obtained 92 surgical colectomy specimens with CRC performed at HC-UFPE between 2005 and 2016 and used Ueno's modified method to evaluate the buddings. In accordance with most large publications, we found a positive, statistically significant association between high grade tumor buddings and (lymph node metastasis) ($p= 0,023$), (lymphovascular invasion) ($p< 0,001$), (perineural invasion) ($p< 0,001$), (infiltrative configuration of the tumor border) ($p< 0,001$) and (tumoral deposits in the mesocolic fat tissue) ($p= 0,005$). In conclusion, high grade tumor budding is indeed associated to other histological biomarkers and Ueno's modified technique is feasible, cost-effective and capable of quantifying buddings with precision.

Keywords: Colorectal neoplasms; Tumor budding; Prognosis.

Introdução

O carcinoma colorretal (CCR) é uma neoplasia maligna epitelial que se origina a partir da mucosa do intestino grosso (SIEGEL et al., 2017). Sendo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer no mundo (AMERICANCANCERSOCIETY, 2017; SAGAERT, 2014; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). É o terceiro tipo de câncer mais diagnosticado em homens (após os tumores de próstata e pulmão) e o segundo entre as mulheres, atrás apenas do câncer de mama (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

O procedimento mais utilizado para confirmação diagnóstica do CCR é a colonoscopia com biópsia. Para avaliar a profundidade da invasão e a disseminação regional e a distância, são utilizadas técnicas como a tomografia computadorizada, a ressonância magnética, ultrassonografia endoscópica pré-operatórias (FREEMAN, 2013).

A maior parte dos pacientes são submetidos a colectomias, e a análise histológica dos espécimes cirúrgicos fornece dados adicionais sobre o estadiamento locorregional da doença (COMPTON, 2006; WHASHINGTON et al., 2009). Desta forma, a redução da mortalidade depende consideravelmente da avaliação histopatológica dos produtos de colectomias, o que permite identificar os fatores prognósticos e utilizá-los para guiar a conduta médica subsequente e estratificar os pacientes quanto ao risco de metástases, desfecho da doença e mortalidade (BOSCH et al., 2013; CUNNINGHAM et al., 2010; SAGAERT, 2014).

Dentre os aspectos prognósticos, a extensão anatômica do tumor pelo estadiamento TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*) é o mais importante parâmetro para o CCR (DUKES, 1980; MOU et al., 2013; SAGAERT, 2014). No entanto, diversos outros biomarcadores histológicos são associados a piores desfechos e por isso são considerados pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* como fatores prognósticos adicionais (MAGUIRE, 2014; WADA et al., 2015; AMIN et al., 2017).

Existem atualmente muitas evidências científicas de que os brotamentos peritumorais (BPT) tenham valor prognóstico independente, comprovadamente

associados a metástases e redução da sobrevida (LUGLI et al., 2017). Portanto, sua avaliação tem o potencial de influenciar na decisão terapêutica. Em maio de 2017, a Conferência para o Consenso Internacional sobre os Brotamentos (*International Tumor Budding Consensus Conference - ITBCC*) (LUGLI et al., 2017), realizada em Berna, Suíça, definiu diretrizes sobre as definições e padronizações das técnicas de avaliação dos brotamentos e sua incorporação na rotina diagnóstica. Contudo, devido ao fato de os grandes estudos sobre os brotamentos serem ainda muito recentes, ainda é necessária investigação adicional sobre o tema, com diferentes metodologias, para maior validação e padronização.

A técnica de Ueno et al modificada (LUGLI et al., 2017; MITROVIC et al., 2012; UENO et al., 2002) vem sendo a mais utilizada nos grandes trabalhos, sendo um método simples, prático e de baixo custo, que utiliza apenas lâminas coradas com HE e apresenta boa concordância interobservador, sendo o método escolhido pelo referido consenso. Define um brotamento como células isoladas ou em grupos de até 4 células que se destacam da borda invasiva do tumor. A contagem desses brotamentos em um campo de 0,785 mm² classifica os tumores como alto grau (10 ou mais brotamentos/campo). Em numerosos trabalhos que utilizaram esta técnica, foi verificada associação estatisticamente significativa entre os brotamentos em alto grau e os outros fatores de mau prognóstico, além de menor sobrevida em 5 anos. (LUGLI et al., 2009, 2017).

Neste estudo, avaliamos histologicamente os aspectos quantitativos e qualitativos dos brotamentos peritumorais em peças cirúrgicas de pacientes com carcinoma colorretal.

Materiais e Métodos

SELEÇÃO DE CASOS

O estudo envolveu 92 peças cirúrgicas de colectomias por câncer colorretal, realizadas entre janeiro de 2005 e junho de 2016 no Hospital das Clínicas da Universidade de Pernambuco (CAAE: 50968115.9.0000.5208).

Incluímos os casos com: diagnóstico histopatológico confirmado de adenocarcinoma colorretal usual ou variante mucinosa; blocos em boas condições

de conservação; laudos contendo informações completas sobre dados clínicos e anatomopatológicos, mínimo de 2 blocos por espécime identificados no exame macroscópico como sendo fragmentos do tumor; peças cirúrgicas com um mínimo de 12 nódulos dissecados.

Foram excluídos os casos com: tumores de outros tipos histológicos; carcinomas *in situ* ou intramucosos (pTis); blocos de parafina em condições inadequadas; menos de 2 blocos referentes ao tecido tumoral; falta de informações essenciais nos laudos; histórico de síndromes hereditárias para o CCR.

Os casos em que o número de linfonodos analisados na peça cirúrgica foi menor que 12 foram excluídos para avaliação da variável “metástases linfonodais”, porém foram utilizados para avaliação dos outros parâmetros.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras finais consistiram de 2 a 5 blocos de parafina por espécime de colectomia, totalizando 344 blocos. Eles foram recortados, com subsequente processamento e coloração pela Hematoxilina e Eosina.

O examinador, em todos os casos, quantificou e graduou os brotamentos pela técnica de Ueno modificada. Além disso, reavaliou os outros parâmetros histológicos intrínsecos dos tumores, como a invasão angiolinfática, invasão perineural, diferenciação tumoral, configuração da borda da lesão, infiltrado linfocitário peritumoral, presença de depósitos tumorais no tecido adiposo pericólico e tipo histológico. Além destes itens, todos os demais parâmetros contidos nos laudos foram catalogados.

O método escolhido para a avaliação dos brotamentos foi o de Ueno modificado. De acordo com esta técnica, o examinador deve primeiramente localizar na lâmina a borda invasiva do tumor, ou seja, a interface tumor-estroma. Para tanto se utiliza a lente objetiva de 5. Ao percorrer tal borda, é possível identificar as áreas mais ricas em brotamentos.

No campo selecionado (*hot spot*), a lente objetiva foi então modificada para a de 20, cujo campo (0,750mm²) foi usado para a contagem dos brotamentos.

Dez ou mais brotamentos em uma área de 0,785mm² classificam os tumores como alto grau. Os casos com 9 ou menos brotamentos por área foram classificados como baixo grau.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software SPSS versão 20. Inicialmente, executou-se uma análise descritiva para verificar as frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e as medidas de posição e dispersão para as variáveis numéricas. Com esta análise foi possível identificar o perfil dos pacientes presentes na amostra, bem como possíveis tendências nos dados.

Para testar a significância das possíveis associações entre a graduação dos brotamentos tumorais e os demais marcadores, construíram-se tabelas de contingência para verificar os percentuais e em seguida foi utilizado o teste *Qui-Quadrado de Independência* e o *Teste Exato de Fisher* que testam a hipótese nula de que não existe associação significativa contra a hipótese alternativa de que essas duas variáveis estão associadas. A regra de decisão destes testes se baseia no p-valor, de forma que se o $p\text{-valor} < 0,05$ conclui-se que existe associação significativa entre as variáveis.

Para mensuração de intensidade das associações significativas, fez-se uso do coeficiente V de Cramér. Para todos os testes estatísticos foi adotado o nível de 5% de significância.

Resultados

Após avaliação histológica dos brotamentos peritumorais pelo método de Ueno modificado, os casos foram classificados como alto grau ou baixo grau. Estes dados foram confrontados com as informações sobre os outros biomarcadores histológicos e outros parâmetros presentes nos laudos anatomopatológicos.

A tabela 4 ilustra o perfil dos 92 pacientes presentes da amostra, bem como possíveis tendências nos dados.

Tabela 4 – Frequências absolutas e percentuais para cada uma das variáveis categóricas e medidas descritivas para as variáveis numéricas.

	Número de pacientes	de %
Tamanho do tumor	média=5,995; padrão=2,267; mediana=5,5;min=2,2; max=12	desvio-

Idade		média=62,1; padrão=12,543; mediana=64;min=32; max=87	desvio-
Sexo			
	Feminino	47	54,70%
	Masculino	39	45,30%
Gradação dos brotamentos tumorais			
	Alto grau	33	35,90%
	Baixo grau	59	64,10%
Diferenciação tumoral			
	Bem	74	79,60%
	Mal	11	11,80%
	Não classificado	8	8,60%
Invasão Angiolinfática			
	Não	49	52,70%
	Sim	44	47,30%
Invasão Perineural			
	Não	70	75,30%
	Sim	23	24,70%
Borda tumoral			
	Expansiva	44	47,80%
	Infiltrativa	48	52,20%
Infiltrado de linfócitos peritumoral			
	Acentuado	5	5,40%
	Discreto	71	77,20%
	Moderado	16	17,40%
Depósitos tumorais na gordura mesocólica			
	Não	74	80,40%
	Sim	18	19,60%
Tipo histológico			
	Adeno	85	91,40%
	Mucinoso	7	7,50%
Estadiamento T			
	1	5	5,50%
	2	10	11,00%
	3	62	68,10%
	4	14	15,40%
Estadiamento N			
	IGN.	6	6,60%
	N+	39	42,90%
	ZERO	46	50,50%
Metástase			
	IGN	88	96,70%
	M+	3	3,30%

Margem proximal		
Comprometida	1	1,20%
Livre	85	98,80%
Margem distal		
Livre	86	92,50%
ignorada	7	7,50%
Margem radial		
ignorada	7	7,60%
Comprometida	15	16,30%
Livre	70	76,10%
Configuração Macroscópica		
Anelar	10	11,80%
Irregular	5	5,90%
Nodular	14	16,50%
Ulcerada	25	29,40%
Vegetante	31	36,50%
Localização do tumor		
Direito	51	59,30%
Esquerdo / reto	33	38,40%
Cólon Transverso	2	2,30%
Radioterapia neoadjuvante		
Não	84	97,70%
Sim	2	2,30%

Conforme observado na tabela 4, obtivemos 33 casos classificados como alto grau (35,9%) e 59 classificados como baixo grau (64,1%).

Do total de casos com brotamentos de alto grau, 19 (63,3%) apresentavam metástases linfonodais e 11 (36,7%) não apresentavam. Quanto aos casos de baixo grau, 35 (63,6%) não exibiram metástases linfonodais e 20 (36,4%) exibiram. Além disto, o teste Exato de Fisher mostrou que existe associação significativa (p -valor $<0,05$) entre a graduação dos brotamentos tumorais de alto grau e as metástases linfonodais, sendo esta associação considerada de fraca a moderada (V de Cramér = 0,259).

Em 25 (75,8%) dos tumores com brotamentos de alto grau houve invasão angiolinfática e em 8 (24,2%) não houve. Entre os tumores de baixo grau, 40 (67,8%) não apresentaram invasão angiolinfática e 19 (32,2%) apresentaram. O teste Exato de Fisher mostrou que existe associação significativa (p -valor $<0,05$)

entre os brotamentos tumorais de alto grau e a invasão angiolinfática, sendo esta associação moderada (V de Cramér = 0,418).

Os resultados mostram que do total de tumores classificados como de alto grau, em 19 (57,6%) deles ocorreu invasão perineural e em 14 (42,4%) não ocorreu. Para os tumores de baixo grau, em 55 (93,2%) deles não houve invasão perineural e em 4 (6,8%) houve. O teste Exato de Fisher mostrou que existe associação significativa (p -valor $<0,05$) entre a graduação dos brotamentos tumorais de alto grau e a invasão perineural, sendo esta associação moderada (V de Cramér = 0,563).

Quanto à configuração da borda tumoral, 26 (78,8%) dos tumores classificados como de alto grau exibiram borda tumoral infiltrativa e 7 (21,2%) exibiram borda do tipo expansiva. Para os tumores classificados como baixo grau, 37 (62,7%) mostraram borda tumoral expansiva e 22 (37,3%) borda infiltrativa. O teste Exato de Fisher mostrou que existe associação significativa (p -valor $<0,05$) entre a graduação dos brotamentos tumorais de alto grau e a borda tumoral infiltrativa, sendo esta associação moderada (V de Cramér = 0,398).

Do total de tumores classificados como de alto grau, 12 (36,4%) tiveram depósitos tumorais na gordura mesocólica e 21 (63,6%) não tiveram. Para os tumores de baixo grau, apenas 6 (10,2%) apresentaram depósitos tumorais na gordura mesocólica e 53 (89,8%) não apresentaram. O teste Exato de Fisher mostrou que existe associação significativa (p -valor $<0,05$) entre a graduação dos brotamentos tumorais de alto grau e os depósitos tumorais na gordura mesocólica, sendo esta associação fraca à moderada (V de Cramer = 0,317).

As demais variáveis categóricas não demonstraram associação estatisticamente significativa com os brotamentos. Todos os valores absolutos e percentuais de distribuição das variáveis entre os grupos de brotamentos de alto e baixo grau estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Frequências absolutas dos brotamentos peritumorais e medidas de associação entre os BPTs e outras variáveis categóricas.

Variável	Categoria	Brotamentos em alto grau	Brotamento em baixo grau	Valor de p	V de Cramér (intensidade da associação)
Metástases Linfonodais (estadiamento N)	Presentes	19 (63,3%)	20 (36,4%)	0,023	0,259
	Ausentes	11 (36,7%)	35 (63,6%)		(fraca a

					moderada)
Invasão angiolinfática	Presente	25 (75,8%)	19 (32,2%)	<0,001	0,418
	Ausente	8 (24,2%)	40 (67,8%)		(moderada)
Invasão perineural	Presente	19 (57,6%)	4 (6,8%)	<0,001	0,563
	Ausente	14 (42,4%)	55 (93,2%)		(moderada)
Borda tumoral	Infiltrativa	26 (78,8%)	22 (37,3%)	<0,001	0,398
	Expansiva	7 (21,2%)	37 (62,7%)		(moderada)
Depósitos tumorais na gordura mesocólica	Presentes	12 (36,4%)	6 (10,2%)	0,005	0,317
	Ausentes	21 (63,6%)	53 (89,8%)		(fraca a moderada)
Diferenciação tumoral	Alta	30 (90,9%)	44 (74,6%)	0,164	0,198
	Baixa	2 (6,1%)	9 (15,3%)		
Estadiamento T	1	1 (3%)	4 (6,9%)	0,182	0,182
	2	1 (3%)	9 (15,5%)		
	3	24 (72,7%)	38 (65,5%)		
	4	7 (21,2%)	7 (12,1%)		
Infiltrado linfocitário peritumoral	Acentuado	3 (9,1%)	2 (3,4%)	0,349	0,151
	Moderado	4 (12,1%)	12 (20,3%)		
	Discreto	26 (78,8%)	45 (76,3%)		
Tipo histológico	Adeno usual	32 (97%)	53 (89,8%)	0,415	0,215
	Mucinoso	1 (3%)	6 (10,2%)		
Estadiamento M	Ignorado	31 (93,9%)	57 (98,3%)	Não se aplica	Não se aplica
	M+	2 (6,1%)	1 (1,7%)		
Margem radial	Comprometida	5 (16,1%)	10 (18,5%)	0,951	0,033
	Livre	26 (83,9%)	44 (81,5%)		
Margem proximal	Comprometida	0 (0%)	1 (1,8%)	0,999	0,081
	Livre	31 (100%)	54 (98,2%)		

Margem distal	Comprometida	0	0	Não se aplica	Não se aplica
	Livre	31	55		
Configuração macroscópica	Anelar	4 (12,9%)	6 (11,1%)	0,652	0,17
	Irregular	2 (6,5%)	3 (5,6%)		
	Nodular	6 (19,4%)	8 (14,8%)		
	Ulcerada	11 (35,4%)	14 (25,9%)		
	Vegetante	8 (25,8%)	23 (42,6%)		
Sexo	Masculino	17 (54,8%)	22 (40%)	0,116	0,143
	Feminino	14 (45,2%)	33 (60%)		
Radioterapia neoadjuvante	Sim	1 (3,2%)	1 (1,8%)	0,999	0,045
	Não	30 (96,8%)	54 (96,2%)		
Localização do tumor	Cólon direito	15 (48,4%)	36 (65,5%)	0,116	0,224
	Cólon esquerdo e reto	16 (51,6%)	17 (30,9%)		
	Cólon transversal	0 (0%)	2 (3,6%)		

Discussão

Existem diversos parâmetros prognósticos já estudados para o CCR. Eles auxiliam a definir a conduta médica e prever o desfecho desta neoplasia. Estes parâmetros podem ser clínicos, laboratoriais, genéticos ou histológicos. Quanto ao último grupo, o estadiamento TNM continua sendo o critério mais importante (AMIN et al., 2017).

Há diversos outros biomarcadores histológicos já estudados que estão associados a mau prognóstico, tais como a invasão vascular neoplásica e o grau de diferenciação tumoral (SAGAERT, 2014).

Os brotamentos peritumorais vêm sendo apontados nos últimos anos como um biomarcador histológico adicional, estando associados em numerosos estudos

com outros fatores de mau prognóstico. Sua validação e padronização são necessárias para que sejam universalmente utilizados na rotina diagnóstica (KOELZER et al., 2015b).

De acordo com as pesquisas, os brotamentos parecem se originar a partir da desdiferenciação das células tumorais periféricas, num processo denominado “transição epitelial-mesenquimal”, o que confere a estas células menos coesão entre si, maior mobilidade no estroma adjacente e capacidade de originar êmbolos na microvasculatura. Desta forma os brotamentos explicariam os eventos biológicos iniciais no processo de agressividade, capacidade infiltrativa e metastatização tumoral.

Os resultados obtidos no presente estudo são, em sua maior parte, condizentes com aqueles observados nos grandes trabalhos recentes que também utilizaram a técnica de Ueno modificada. Houve associação estatisticamente significativa entre os brotamentos peritumorais em alto grau e outros achados histológicos de mau prognóstico, como a invasão neoplásica angiolinfática, a presença de metástases para linfonodos regionais, a infiltração neoplásica perineural, borda tumoral do tipo infiltrativa e depósitos tumorais no tecido adiposo mesocólico. Já os tumores classificados como de baixo grau apresentaram tendências de agrupamento nos casos com características opostas (NANDITA et al., 2016; SERT BEKTAŞ et al., 2012).

Apesar de não constarem usualmente nas publicações, consideramos de grande valia a inclusão em nosso estudo do valor estatístico “V de Cramér”, na medida em que este teste indica a intensidade das associações entre os brotamentos e os outros parâmetros, tornando a avaliação mais precisa. Nos casos em que obtivemos associações estatisticamente significativas ($p < 0,05$), a intensidade de associação pelo teste V de Cramér mostrou-se fraca a moderada, provavelmente devido à nossa relativamente baixa casuística.

Semelhantemente às grandes publicações, não houve associação entre os brotamentos e outros parâmetros que não são considerados de valor prognóstico, como a localização do tumor, configuração macroscópica da neoplasia e gênero do paciente (HASE et al., 1993b; LUGLI; KARAMITOPOULOU; ZLOBEC, 2012; NIZZE; BARTEN; PRALL, 2005).

Quanto ao grau histológico (diferenciação do adenocarcinoma), não obtivemos a associação estatisticamente significativa que ocorreu nos principais estudos entre os brotamentos em alto grau e os carcinomas pouco diferenciados (UENO et al., 2002), talvez devido à nossa casuística com poucos tumores deste último grupo.

Nos estudos com maior casuística, observou-se associação estatisticamente significativa entre os brotamentos em alto grau e a maior profundidade de invasão tumoral na parede intestinal (estadiamento T). No nosso trabalho, houve uma tendência neste sentido, porém não atingimos significância estatística, talvez pela dispersão dos casos em quatro categorias (T1, T2, T3, T4) (TANAKA et al., 2003; UENO et al., 2002).

A margem cirúrgica radial comprometida, que está diretamente relacionada ao estadiamento T, também não revelou associação estatisticamente significativa em nosso trabalho, possivelmente devido ao baixo número de casos com margem comprometida.

Os dados referentes a metástases a distância (estadiamento M) mostraram-se ignorados em 93,9% dos nossos casos, impossibilitando análise estatística adequada.

Ainda entre os parâmetros sem associação estatisticamente significativa, encontramos o item “Infiltrado Linfocitário Peritumoral”. Este biomarcador tem sido bastante pesquisado recentemente e parece corresponder a uma resposta imune contra o tecido neoplásico, de maneira que, quanto mais intenso o infiltrado, melhor o prognóstico e menor a quantidade de brotamentos. Contudo, a quantificação deste infiltrado ainda necessita de métodos mais simples e reproduzíveis (LUGLI et al., 2009). Consideramos a graduação do infiltrado bastante subjetiva e de difícil caracterização.

As definições do que sejam os brotamentos peritumorais e as técnicas para sua graduação são numerosas e divergentes nos grandes estudos e ainda necessitam de padronização e validação para que este marcador possa ser incluído na rotina diagnóstica dos carcinomas colorretais. A técnica de Ueno modificada tem-se revelado simples, de baixo custo e de rápida execução. Foi o método mais utilizado na maioria dos trabalhos, especialmente os mais recentes, sempre mostrando associação estatisticamente significativa entre os brotamentos de alto

grau, fatores de mau prognóstico, metástases e redução da sobrevida (DE SMEDT; PALMANS; SAGAERT, 2016; KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016; LUGLI et al., 2017). Em estudos que utilizaram análise univariada e multivariada, os brotamentos mostraram que estas associações são independentes de outras variáveis. Por estas razões, a técnica de Ueno modificada é atualmente recomendada pelo ITBCC e pela Sociedade Japonesa de Cancer Colorretal (LUGLI et al., 2017; WATANABE et al., 2015). Em nosso estudo, a técnica mostrou-se factível e aplicável na rotina diagnóstica.

Constatamos, contudo, alguns aspectos que justificariam estudos posteriores para maior consolidação, validação e padronização da técnica em questão. Dentre as principais divergências da literatura, observamos que a graduação dos brotamentos ainda é bastante diversificada. Pela recomendação do ITBCC e da SJCC, a graduação possui 3 níveis (baixo grau, grau intermediário e alto grau). Julgamos que a classificação bimodal (alto e baixo grau) seja mais reproduzível entre diferentes observadores, além de facilitar análises estatísticas em estudos com menor casuística, como o nosso, uma vez que ocorre menor dispersão dos casos quando são divididos em apenas 2 categorias. Estas vantagens da divisão bimodal foram confirmadas em outros estudos (SERT BEKTAŞ et al., 2012; UENO et al., 2002).

Outro problema comum na avaliação dos brotamentos, que pode motivar novos trabalhos, encontra-se na concordância interobservador, que pode ser medida estatisticamente pelo índice kappa. A análise deste índice foi realizada em poucos estudos, necessitando ser abordada em outros trabalhos (MITROVIC et al., 2012). No trabalho original de Ueno, o autor realizou apenas a medida de concordância intraobservador. Devido ao fato de os brotamentos serem um fator recentemente estudado, não incluímos a medida do índice kappa, pois os patologistas da nossa instituição ainda não estão familiarizados com a avaliação dos brotamentos e este fator não é atualmente incluído em nossos laudos.

Nos trabalhos em que índice kappa de reprodutibilidade interobservador foi medido, os resultados foram bastante discrepantes, com índices desde fracos até substanciais (KOELZER; ZLOBEC; LUGLI, 2016; MITROVIC et al., 2012).

Há métodos mais complexos do que o de Ueno, nos quais a contagem dos brotamentos se faz a partir da média de 10 campos de grande aumento (lente

objetiva de 40) ou ainda de toda borda invasiva da neoplasia (HORCIC et al., 2013b). Isto se faz na tentativa de tornar a contagem mais fidedigna e mais reprodutível. Consideramos, assim como os consensos recentes, que estas técnicas sejam demasiadamente laboriosas e demoradas para ser usadas na rotina. Ademais, os ganhos em termos de significância estatística quando se usam vários campos foram geralmente pequenos ou ausentes (MITROVIC et al., 2012; VAN WYK et al., 2015).

Outros métodos descritos na literatura utilizaram imunistoquímica com anticorpos anti-pancitoqueratina, na tentativa de melhor individualização dos brotamentos e distinção destes com células inflamatórias e mesenquimais, frequentemente presentes na interface tumor-estroma. De acordo com alguns destes estudos, conseguiu-se uma melhora na concordância interobservador na gradação dos brotamentos (SATO et al., 2014). Entretanto, a maior parte dos trabalhos mostraram apenas um modesto aumento desta concordância e não demonstraram maior associação entre brotamentos e pior desfecho da doença, quando comparados com os métodos convencionais, que só utilizam a coloração HE (DE SMEDT; PALMANS; SAGAERT, 2016). Desta forma, o uso da IHQ não parece justificado em todos os casos, uma vez que seria desnecessariamente dispendioso e demorado. O ITBCC recomenda a utilização da IHQ apenas em casos selecionados, onde a individualização dos brotamentos pelo HE seja obscurecida por infiltrados inflamatórios intensos, necrose ou células mesenquimais ativadas (LUGLI et al., 2017).

Conclusões

O método de Ueno modificado para avaliação qualiquantitativa dos brotamentos peritumorais revelou-se uma metodologia simples e prática, com rápida execução e pouco dispêndio financeiro. Através desta técnica observamos associação estatisticamente significativa entre os brotamentos de alto grau e outros biomarcadores de mau prognóstico, atestando o caráter agressivo dos BPTs no câncer colorretal.

Assim como em outros estudos que avaliaram os BPTs, não encontramos associação entre os brotamentos e outras variáveis não associadas ao

comportamento biológico dos tumores, como a configuração macroscópica, a localização das neoplasias e o gênero dos pacientes, mas cabe ressaltar que são recomendáveis estudos futuros com desenhos prospectivos e que sejam realizados com equipes multidisciplinares, incluindo patologistas, oncologistas e cirurgiões oncológicos, possibilitando a obtenção de resultados mais abrangentes, como sobrevida e resposta terapêutica, que não constam em nossa pesquisa.

Ainda como perspectivas futuras, consideramos também pertinente a investigação adicional em nível molecular dos demais componentes da interface tumor-estroma, notadamente os aspectos qualitativos e quantitativos do infiltrado inflamatório peritumoral e sua relação com os BPTs.

Referências

AMERICANCANCERSOCIETY. Colorectal Cancer Facts&Figures 2017-2019 American Cancer Society. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225001>>.

BOSCH, S. et al. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: A systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*, v. 45, n. 10, p. 827–834, 2013.

COMPTON, C. C. Key issues in reporting common cancer specimens: problems in pathologic staging of colon cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 130, n. 3, p. 318–24, 2006.

CUNNINGHAM, D. et al. Colorectal cancer. *The Lancet*, v. 375, n. 9719, p. 1030–1047, 2010.

DE SMEDT, L.; PALMANS, S.; SAGAERT, X. Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do? *Virchows Archiv*, 2016.

DUKES, C. E. The classification of cancer of the rectum. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 23, n. 8, p. 605–611, 1980.

FREEMAN, H. J. Early stage colon cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 19, n. 46, p. 8468–73, 2013.

HASE, K. et al. Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 36, n. 7, p. 627–635, 1993b.

HORCIC, M. et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Human Pathology*, v. 44, n. 5, p. 697–705, 2013b.

KOELZER, V. H. et al. Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a

multicenter interobserver study. *Virchows Archiv*, v. 466, n. 5, p. 485–493, 2015b.

KOELZER, V. H.; ZLOBEC, I.; LUGLI, A. Tumor budding in colorectal cancer - Ready for diagnostic practice? *Human Pathology*, v. 47, n. 1, p. 4–19, 2016.

LUGLI, A. et al. CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a “pro-/anti-tumour” approach to tumour host interaction in colorectal cancer. *British journal of cancer*, v. 101, n. 8, p. 1382–92, 2009.

LUGLI, A. et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*, n. February, p. 1–13, 2017.

LUGLI, A.; KARAMITOPOULOU, E.; ZLOBEC, I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, v. 106, n. 11, p. 1713–1717, 2012.

MAGUIRE, A. Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 29, p. 9850, 2014.

MITROVIC, B. et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, v. 25, n. 10, p. 1315–25, 2012.

MOU, S. et al. Pathologic predictive factors for lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*, 2013.

NANDITA, K. P. et al. Tumour budding: A promising parameter in oral squamous cell carcinoma. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 7, n. 5, p. 2059–2063, 2016.

NIZZE, H.; BARTEN, M.; PRALL, F. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology*, v. 47, n. 1, p. 17–24, 2005.

SAGAERT, X. Prognostic biomarkers in colorectal cancer: where do we stand? *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, v. 464, n. 3, p. 379–91, 2014.

SATOH, K. et al. Tumor budding in colorectal carcinoma assessed by cytokeratin immunostaining and budding areas: Possible involvement of c-Met. *Cancer Science*, v. 105, n. 11, p. 1487–1495, 2014.

SERT BEKTAŞ, S. et al. Tumor budding in colorectal carcinomas. *Türk patoloji dergisi*, v. 28, n. 1, p. 61–6, 2012.

SIEGEL, R. L. et al. Colorectal Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, v. 000, p. 0–0, 2017.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer*

Journal for Clinicians, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

TANAKA, M. et al. Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*, v. 46, n. 8, p. 1054–1059, 2003.

UENO, H. et al. Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, v. 40, n. 2, p. 127–132, 2002.

VAN WYK, H. C. et al. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review *Cancer Treatment Reviews*, 2015.

WADA, H. et al. Systematic review and meta-analysis of histopathological predictive factors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology*, v. 50, n. 7, p. 727–734, 2015.

WATANABE, T. et al. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 2, p. 207–239, 2015.

WHASHINGTON, M. et al. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. *Arch Pathol Lab Med*, v. 133, n. 10, p. 1539–1551, 2009.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, nosso estudo mostrou a aplicabilidade do método de Ueno modificado para avaliação qualiquantitativa dos brotamentos peritumorais. A técnica revelou-se simples e prática, com rápida execução e pouco dispêndio financeiro, já que as lâminas utilizadas só precisaram ser coradas com a Hematoxilina/ Eosina. Atingimos nosso objetivo de comprovar associação estatisticamente significativa entre os brotamentos de alto grau e outros biomarcadores de mau prognóstico, atestando o caráter agressivo dos BPTs no câncer colorretal.

Assim como em outros estudos que avaliaram os BPTs, não encontramos associação entre os brotamentos e outras variáveis não associadas ao comportamento biológico dos tumores, como a configuração macroscópica, a localização das neoplasias e o gênero dos pacientes.

Dentre as principais limitações desta pesquisa, citamos a pequena casuística e a ausência da avaliação estatística da concordância interobservador.

Julgamos necessários novos estudos com maior número de amostras, que incluam mais de um examinador, e que utilizem os critérios de classificação recentemente unificados no consenso de Berna. Seriam ainda recomendáveis estudos com desenho diferente, de preferência prospectivos e que sejam realizados com equipes multidisciplinares, incluindo patologistas, oncologistas e cirurgiões oncológicos, possibilitando a obtenção de resultados mais abrangentes, como sobrevida e resposta terapêutica, que não constam em nossa pesquisa.

Ainda como perspectivas futuras, ressaltamos o grande avanço recente no conhecimento da biologia molecular e genética dos brotamentos. A Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM), apontada como principal fenômeno implicado na gênese dos BPTs, envolve um conjunto de mutações e alterações moleculares que culminam na desdiferenciação das células carcinomatosas, tornando-as mais invasivas e resistentes à apoptose. Atualmente, as pesquisas concentram-se na identificação de novas mutações e vias de sinalização molecular que causam a TEM, pois cada uma destas etapas moleculares pode ser alvo de terapias específicas, capazes de inibir este processo. Consideramos também pertinente a investigação adicional em nível molecular dos demais componentes da interface tumor-estroma, notadamente os aspectos qualitativos e quantitativos do infiltrado inflamatório peritumoral e sua relação com os BPTs.

REFERÊNCIAS

- ALMANGUSH, A. et al. **Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: A meta-analysis** *Histopathology*, 2016.
- AMERICANCANCERSOCIETY. **Colorectal Cancer Facts&Figures 2017-2019** American Cancer Society. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24225001>>.
- BARRESI, V. et al. **Histological grading in colorectal cancer: New insights and perspectives** *Histology and Histopathology*, 2015.
- BETGE, J. et al. **Tumor Budding is an Independent Predictor of Outcome in AJCC/UICC Stage II Colorectal Cancer**. *Annals of Surgical Oncology*, v. 19, n. 12, p. 3706–3712, 2012.
- BOLOCAN, A. et al. **Prognostic and predictive factors in colorectal cancer**. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, v. 107, n. 5, p. 555–563, 2012.
- BOSCH, S. et al. **Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: A systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions**. *Endoscopy*, v. 45, n. 10, p. 827–834, 2013.
- BRENNER, H.; KLOOR, M.; POX, C. P. **Colorectal cancer**. *The Lancet*, v. 383, n. 9927, p. 1490–1502, 2014.
- BRONSERT, P. et al. **Cancer cell invasion and EMT marker expression - a three-dimensional study of the human cancer-host interface -**. *The Journal of pathology*, v. 234, n. 3, p. 410–422, 2014.
- CAIE, P. D. et al. **Quantification of tumour budding, lymphatic vessel density and invasion through image analysis in colorectal cancer**. *Journal of translational medicine*, v. 12, n. 1, p. 156, 2014.
- CAMPBELL, T. **Colorectal cancer. Part 1: Epidemiology, aetiology, screening and diagnosis**. *Professional Nurse London England*, v. 14, n. 12, p. 869–874, 1999.
- CANCER, T. I. A. FOR R. ON. **WHO Classification of Tumours of the Digestive System**. 4th. ed. [s.l.] WHO, 2010.
- CHOI, J. Y. et al. **Meta-analysis of Predictive Clinicopathologic Factors for Lymph Node Metastasis in Patients with Early Colorectal Carcinoma**. *Journal of Korean Medical Science*, v. 30, n. 4, p. 398, 2015.
- COMPTON, C. C. et al. **Prognostic factors in colorectal cancer**. *College of American Pathologists Consensus Statement 1999*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, v. 124, n. 7, p. 979–994, 2000.
- COMPTON, C. C. **Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular**

features. Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, v. 16, n. 4, p. 376–88, 2003.

COMPTON, C. C. **Key issues in reporting common cancer specimens: problems in pathologic staging of colon cancer.** Archives of pathology & laboratory medicine, v. 130, n. 3, p. 318–24, 2006.

CONNOR, K. O. et al. **Tumor Budding Is an Independent Adverse Prognostic Factor in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.** American journal of surgical pathology, v. 39, n. 4, p. 472–478, 2015.

CUNNINGHAM, D. et al. **Colorectal cancer.** The Lancet, v. 375, n. 9719, p. 1030–1047, 2010.

DAWSON, H. et al. **The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome.** Histopathology, v. 64, n. 4, p. 577–584, 2014.

DAWSON, H. et al. **Tyrosine kinase receptor B (TrkB) expression in colorectal cancers highlights anoikis resistance as a survival mechanism of tumour budding cells.** Histopathology, v. 66, n. 5, p. 715–725, 2015.

DAWSON, H.; LUGLI, A. **Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer.** Frontiers in medicine, v. 2, n. March, p. 11, 2015.

DE LA CHAPELLE, A. **Genetic predisposition to colorectal cancer.** Nature Reviews Cancer, v. 4, n. 10, p. 769–780, 2004.

DE SMEDT, L. et al. **Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching.** British Journal of Cancer, v. 116, n. 1, p. 58–65, 2017.

DE SMEDT, L.; PALMANS, S.; SAGAERT, X. **Tumour budding in colorectal cancer: what do we know and what can we do?** Virchows Archiv, 2016.

DERWINGER, K.; CARLSSON, G.; GUSTAVSSON, B. **A study of lymph node ratio as a prognostic marker in colon cancer.** European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, v. 34, n. 7, p. 771–5, 2008.

DIENSTMANN, R. et al. **Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer.** Nature Reviews Cancer, 2017.

DUKES, C. E. **The classification of cancer of the rectum.** Diseases of the Colon & Rectum, v. 23, n. 8, p. 605–611, 1980.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** Annals of surgical oncology, v. 17, n. 6, p. 1471–4, 2010.

FREEMAN, H. J. **Early stage colon cancer.** World journal of gastroenterology : WJG, v. 19, n. 46, p. 8468–73, 2013.

GABBERT, H. et al. **Tumor dedifferentiation: An important step in tumor invasion.** Clinical & Experimental Metastasis, v. 3, n. 4, p. 257–279, 1985.

GALVÁN, J. A. et al. **TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer.** Oncotarget, v. 6, n. 2, p. 874–85, 2015.

GIGER, O. T. et al. **Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer.** Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, v. 25, n. 7, p. 1048–53, 2012.

GRAHAM, R. P. et al. **Tumor Budding in Colorectal Carcinoma: Confirmation of Prognostic Significance and Histologic Cutoff in a Population-based Cohort.** The American journal of surgical pathology, v. 39, n. 10, p. 1340–1346, 2015.

GUINNEY, J. et al. **The consensus molecular subtypes of colorectal cancer.** Nature Medicine, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2015.

HASE, K. et al. **Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer.** Diseases of the colon and rectum, v. 36, n. 7, p. 627–635, 1993a.

HASE, K. et al. **Prognostic value of tumor “budding” in patients with colorectal cancer.** Diseases of the Colon & Rectum, v. 36, n. 7, p. 627–635, 1993b.

HORCIC, M. et al. **Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer.** Human pathology, v. 44, n. 5, p. 697–705, 2013a.

HORCIC, M. et al. **Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer.** Human Pathology, v. 44, n. 5, p. 697–705, 2013b.

IHNÁT, P. et al. **The Impact of Standard Protocol Implementation on the Quality of Colorectal Cancer Pathology Reporting.** World Journal of Surgery, v. 39, n. 1, p. 259–265, 2014.

IMAI, T. **The growth of human carcinoma: a morphological analysis.** Fukoka Igaku Zasshi, v. 45, n. 30, 1954.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. [s.l: s.n.].

ISHIKAWA, Y. et al. **Histopathologic determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer.** Cancer, v. 112, n. 4, p. 924–933, 2008.

JASS, J. R. et al. **Assessment of invasive growth pattern and lymphocytic infiltration in colorectal cancer.** *Histopathology*, v. 28, n. 6, p. 543–8, 1996.

JASS, J. R. **Pathogenesis of colorectal cancer** *Surgical Clinics of North America*, 2002.

JOLLY, M. K. et al. **Stability of the hybrid epithelial/mesenchymal phenotype** *Oncotarget*, 2016. Disponível em: <<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=8166&path%5B%5D=24085>>

JONKER, D. J.; SPITHOFF, K.; MAROUN, J. **Adjuvant Systemic Chemotherapy for Stage II and III Colon Cancer after Complete Resection: An Updated Practice Guideline.** *Clinical Oncology*, v. 23, n. 5, p. 314–322, 2011.

KANTHAN, R.; SENGER, J.-L.; KANTHAN, S. C. **Molecular events in primary and metastatic colorectal carcinoma: a review.** *Pathology research international*, v. 2012, n. since 2006, p. 597497, 2012.

KARAMITOPOULOU, E. et al. **Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer.** *Modern Pathology*, v. 26, n. 2, p. 295–301, 2013.

KEVANS, D. et al. **Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Protein Expression in a Cohort of Stage II Colorectal Cancer Patients With Characterized Tumor Budding and Mismatch Repair Protein Status.** *International Journal of Surgical Pathology*, v. 19, n. 6, p. 751–760, 2011.

KOELZER, V. H. et al. **Active immunosurveillance in the tumor microenvironment of colorectal cancer is associated with low frequency tumor budding and improved outcome.** *Translational Research*, v. 166, n. 2, p. 207–217, 2015a.

KOELZER, V. H. et al. **Tumor budding in colorectal cancer revisited: results of a multicenter interobserver study.** *Virchows Archiv*, v. 466, n. 5, p. 485–493, 2015b.

KOELZER, V. H.; ZLOBEC, I.; LUGLI, A. **Tumor budding in colorectal cancer - Ready for diagnostic practice?** *Human Pathology*, v. 47, n. 1, p. 4–19, 2016.

KÖHNE, C.-H. **Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? Against the proposal.** *The lancet oncology*, v. 7, n. 3, p. 516–517, 2006.

LAM, A. K. Y.; CHAN, S. S. Y.; LEUNG, M. **Synchronous colorectal cancer: Clinical, pathological and molecular implications.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 22, p. 6815–6820, 2014.

LANGNER, C. et al. **Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of**

poor prognosis? *Histopathology*, v. 60, n. 7, p. 1060–72, 2012.

LANZA, G. et al. **Colorectal tumors: The histology report.** *Digestive and Liver Disease*, v. 43, n. 4, p. S344–S355, 2011.

LENNON, A. M. et al. **Peritoneal involvement in stage II colon cancer.** *American Journal of Clinical Pathology*, v. 119, n. 1, p. 108–113, 2003.

LO, D. S. et al. **Prognostic significance of mesenteric tumor nodules in patients with stage III colorectal cancer.** *Cancer*, v. 112, n. 1, p. 50–54, 2008.

LOSI, L. et al. **Prognostic significance of histological features and biological parameters in stage I (pT1 and pT2) colorectal adenocarcinoma.** *Pathology Research and Practice*, v. 202, n. 9, p. 663–670, 2006.

LUGLI, A. et al. **CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a “pro-/anti-tumour” approach to tumour host interaction in colorectal cancer.** *British journal of cancer*, v. 101, n. 8, p. 1382–92, 2009.

LUGLI, A. et al. **Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016.** *Modern Pathology*, n. February, p. 1–13, 2017.

LUGLI, A.; KARAMITOPOULOU, E.; ZLOBEC, I. **Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer.** *British Journal of Cancer*, v. 106, n. 11, p. 1713–1717, 2012.

MACIAS-GARCIA, F. et al. **A clinical model for predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal cancer.** *International Journal of Colorectal Disease*, v. 30, n. 6, p. 761–768, 2015.

MAGUIRE, A. **Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 29, p. 9850, 2014.

MITROVIC, B. et al. **Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, v. 25, n. 10, p. 1315–25, 2012.

MIYACHI, H. et al. **Management of T1 colorectal cancers after endoscopic treatment based on the risk stratification of lymph node metastasis.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, v. 31, n. 6, 2016.

MLECNIK, B. et al. **The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis.** *Science Translational Medicine*, v. 8, n. 327, p. 327ra26–327ra26, 2016.

MORODOMI, T. et al. **An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers.** *Lymph node metastasis and the histopathology of*

actively invasive regions of cancer. *Cancer*, v. 63, p. 539–543, 1989.

MOU, S. et al. **Pathologic predictive factors for lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis** *Surgical Endoscopy and Other Interventional Techniques*, 2013.

NAGTEGAAL, I. D. et al. **Circumferential margin involvement is still an important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit.** *The American journal of surgical pathology*, v. 26, n. 3, p. 350–7, 2002.

NANDITA, K. P. et al. **Tumour budding: A promising parameter in oral squamous cell carcinoma.** *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, v. 7, n. 5, p. 2059–2063, 2016.

NIZZE, H.; BARTEN, M.; PRALL, F. **Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma.** *Histopathology*, v. 47, n. 1, p. 17–24, 2005.

O'BRIEN, M. J.; ZHAO, Q.; YANG, S. **Colorectal serrated pathway cancers and precursors** *Histopathology*, 2015.

OHTSUKI, K. et al. **Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma.** *Anticancer Research*, v. 28, n. 3, p. 1831–1836, 2008.

OKUYAMA, T.; NAKAMURA, T.; YAMAGUCHI, M. **Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma.** *Diseases of the Colon and Rectum*, v. 46, n. 10, p. 1400–1406, 2003.

PONZ DE LEON, M. et al. **Aetiology of colorectal cancer and relevance of monogenic inheritance.** *Gut*, v. 53, n. 1, p. 115–22, 2004.

PRALL, F. **Tumour budding in colorectal carcinoma** *Histopathology*, 2007.

PUPPA, G. et al. **Diagnostic reproducibility of tumour budding in colorectal cancer: a multicentre, multinational study using virtual microscopy.** *Histopathology*, v. 61, n. 4, p. 562–575, 2012.

REGGIANI BONETTI, L. et al. **Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: what is and ought to be known.** *Diagnostic Pathology*, v. 11, n. 1, p. 31, 2016.

RESCH, A.; LANGNER, C. **Lymph node staging in colorectal cancer: old controversies and recent advances.** *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 19, n. 46, p. 8515–26, 2013.

RODRIGUES COY, C. S. **Colorectal cancer prevention in Brazil - where are we?** *Journal of Coloproctology*, v. 33, n. 3, p. 111–112, 2013.

- RODRIGUEZ-SALAS, N. et al. **Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017.
- ROGERS, A. C. et al. **Prognostic significance of tumor budding in rectal cancer biopsies before neoadjuvant therapy.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, v. 27, n. 1, p. 156–62, 2014.
- ROGERS, A. C. et al. **Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer.** *British Journal of Cancer*, v. 115, n. 7, p. 831–840, 2016.
- SAGAERT, X. **Prognostic biomarkers in colorectal cancer: where do we stand?** *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, v. 464, n. 3, p. 379–91, 2014.
- SALHIA, B. et al. **High tumor budding stratifies breast cancer with metastatic properties.** *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 150, n. 2, p. 363–371, 2015.
- SATOH, K. et al. **Tumor budding in colorectal carcinoma assessed by cytokeratin immunostaining and budding areas: Possible involvement of c-Met.** *Cancer Science*, v. 105, n. 11, p. 1487–1495, 2014.
- SCHNEIDER, N. I.; LANGNER, C. **Prognostic stratification of colorectal cancer patients: Current perspectives** *Cancer Management and Research*, 2014.
- SERT BEKTAŞ, S. et al. **Tumor budding in colorectal carcinomas.** *Türk patoloji dergisi*, v. 28, n. 1, p. 61–6, 2012.
- SIEGEL, R. L. et al. **Colorectal Cancer Statistics, 2017.** *CA Cancer J Clin*, v. 000, p. 0–0, 2017.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2017.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.
- SINICROPE, F. A et al. **Molecular Markers Identify Subtypes of Stage III Colon Cancer Associated With Patient Outcomes.** *Gastroenterology*, v. 148, n. 1, p. 88–99, 2014.
- STEINESTEL, K. et al. **Invasion pattern and histologic features of tumor aggressiveness correlate with MMR protein expression, but are independent of activating KRAS and BRAF mutations in CRC.** *Virchows Archiv*, v. 465, n. 2, p. 155–163, 2014.
- STRYKER, S. J. et al. **Natural history of untreated colonic polyps.** *Gastroenterology*, v. 93, n. 5, p. 1009–13, 1987.
- SY, J. et al. **Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer.** *Diseases of the Colon and Rectum*, v. 53, n. 3, p. 301–307, 2010.
- TALBOT, L. J.; BHATTACHARYA, S. D.; KUO, P. C. **Epithelial-mesenchymal**

transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignanciesInternational Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2012.

TANAKA, M. et al. **Tumor budding at the invasive margin can predict patients at high risk of recurrence after curative surgery for stage II, T3 colon cancer.** Diseases of the Colon and Rectum, v. 46, n. 8, p. 1054–1059, 2003.

TANAKA, S. et al. **Towards safer and appropriate application of endoscopic submucosal dissection for T1 colorectal carcinoma as total excisional biopsy: future perspectives.** Digestive endoscopy: official journal of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society, v. 27, n. 2, p. 216–222, 2015.

TATEISHI, Y. et al. **Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma.** Modern Pathology, v. 23, n. 8, p. 1068–1072, 2010.

THIERY, J. P. et al. **Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease**Cell, 2009.

UENO, H. et al. **Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer.** Histopathology, v. 40, n. 2, p. 127–132, 2002.

UENO, H. et al. **Risk Factors for an Adverse Outcome in Early Invasive Colorectal Carcinoma.** Gastroenterology, v. 127, n. 2, p. 385–394, 2004.

UENO, H. et al. **Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis.** Annals of surgical oncology, v. 22, n. 5, p. 1504–12, 2015.

VAN WYK, H. C. et al. **The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review**Cancer Treatment Reviews, 2015.

VÄYRYNEN, J. P. et al. **Detailed analysis of inflammatory cell infiltration in colorectal cancer.** British journal of cancer, v. 109, n. August, p. 1839–47, 2013.

WADA, H. et al. **Systematic review and meta-analysis of histopathological predictive factors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer.** Journal of Gastroenterology, v. 50, n. 7, p. 727–734, 2015.

WANG, L. M. et al. **Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer.** The American journal of surgical pathology, v. 33, n. 1, p. 134–141, 2009.

WARTENBERG, M. et al. **Accumulation of FOXP3+T-cells in the tumor microenvironment is associated with an epithelial-mesenchymal-transition-type tumor budding phenotype and is an independent prognostic factor in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma.** Oncotarget, v. 6, n. 6, p.

4190–201, 2015.

WATANABE, T. et al. **Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer.** International Journal of Clinical Oncology, v. 20, n. 2, p. 207–239, 2015.

WHASHINGTON, M. et al. **Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum.** Arch Pathol Lab Med, v. 133, n. 10, p. 1539–1551, 2009.

WOOD, L. D. **Update on colorectal polyps and polyposis syndromes** Diagnostic Histopathology, 2014.

YAMADA, N. et al. **Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition.** Human Pathology, v. 60, p. 151–159, 2017.

YAMAUCHI, H. **Pathological predictors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer.** Surg today, v. 38, n. 38, p. 905–910, 2008.

YIU, A. J.; YIU, C. Y. **Biomarkers in colorectal cancer.** Anticancer Research, v. 36, n. 3, p. 1093–1102, 2016.

ZLOBEC, I. et al. **Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastases in colon and rectal cancer patients.** British journal of cancer, v. 110, n. November, p. 1–6, 2013.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

31/07/2017

Plataforma Brasil

Saúde



principal



marcelo do rego maciel souto maior

Sua sessão expira em:

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:

50968115.9.0000.5208

Número do Parecer:

Pesquisar

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

Avaliação dos Brotamentos Peritumorais no Câncer Colorretal

Número do CAAE:

50968115.9.0000.5208

Número do Parecer:

1348982

Quem Assinou o Parecer:

LUCIANO TAVARES MONTENEGRO

Pesquisador Responsável:

marcelo do rego maciel souto maior

Data Início do Cronograma:

05/11/2015

Data Fim do Cronograma:

10/02/2017

Contato Público:

marcelo do rego maciel souto maior

ANEXO B – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO (2015-2017)

02/08/2017

SIG@

Consultas [Detalhamento de Discente](#) Histórico Escolar

Histórico Escolar

Nome: MARCELO DO REGO MACIEL SOUTO MAIOR
 Curso: PATOLOGIA - MESTRADO
 Período Admissão: 2015.1
 Tipo do Ingresso: PROCESSO DE SELEÇÃO
 Data de Emissão: 02/08/2017 14:11

Período: 2017.1

MATRÍCULA VÍNCULO

Período: 2016.2

MATRÍCULA VÍNCULO

Período: 2016.1

Componente Curricular
 PA962 - DIDÁTICA DO ENSINO SUPERIOR

Faltas	CH	Créditos	Conceito	Situação
1	45	3	A	APROVADO

Período: 2015.2

Componente Curricular
 PA922 - MÉTODOS ESPECIAIS EM HISTOTECNOLOGIA
 PA929 - TÓPICOS AVANÇADOS EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
 PA928 - TÓPICOS AVANÇADOS EM PATOLOGIA

Faltas	CH	Créditos	Conceito	Situação
0	45	3	A	APROVADO
0	45	3	A	APROVADO
2	45	3	A	APROVADO

Período: 2015.1

Componente Curricular
 PA954 - ARTIGO CIENTÍFICO EM SAÚDE
 PA905 - BIOESTATÍSTICA
 PA902 - METODOLOGIA DA PESQUISA CIENTÍFICA
 PA955 - PATOLOGIA MOLECULAR
 PA956 - TÓPICOS DE HISTOPATOLOGIA E CITOLOGIA

Faltas	CH	Créditos	Conceito	Situação
0	30	2	A	APROVADO
3	30	2	A	APROVADO
0	45	3	B	APROVADO
0	45	3	A	APROVADO
0	30	2	A	APROVADO