



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

ANA MARGARIDA COELHO ABRANTES

**Avaliação da influência das características histológicas e
moleculares do cancro colo-rectal no padrão de crescimento
histológico da metástase hepática**

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE CIRURGIA GERAL/ANATOMIA PATOLÓGICA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSOR DOUTOR JOSÉ GUILHERME LOPES RODRIGUES TRALHÃO
DOUTOR RUI PEDRO CAETANO MOREIRA DE OLIVEIRA

abril/2022

Avaliação da influência das características histológicas e moleculares do cancro colo-rectal no padrão da metástase hepática

Ana Margarida Abrantes¹, Bárbara Oliveiros^{2,3}, Maria Augusta Cipriano^{4,5}, Rui Caetano-Oliveira^{4,5}, José Guilherme Tralhão^{5,6}

¹Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

²Laboratório de Bioestatística e Informática Médica, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

³Instituto de Investigação Clínica e Biomédica, Área do Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁴Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

⁵Centro Académico Clínico de Coimbra CHUC

⁶Serviço de Cirurgia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Coimbra, Portugal

Autor correspondente: Ana Margarida Coelho Abrantes, mabrant@fmed.uc.pt

Morada institucional: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Polo III – Polo das Ciências da Saúde Azinhaga de Santa Comba, Celas, 3000-548 Coimbra.

Índice

| | Página |
|---|---------------|
| Resumo _____ | 5 |
| Abstract _____ | 7 |
| Lista de abreviaturas, acrónimos e símbolos _____ | 9 |
| Introdução _____ | 11 |
| Material e Métodos _____ | 13 |
| Resultados _____ | 17 |
| Discussão _____ | 22 |
| Conclusão _____ | 26 |
| Agradecimentos _____ | 33 |
| Referências Bibliográficas _____ | 27 |
| Anexos _____ | 33 |

Resumo

Introdução: O cancro colorretal (CCR) é o terceiro tipo de cancro mais comum no mundo, ocupando o segundo lugar no que diz respeito à mortalidade. Estima-se que mais de 50% dos doentes com diagnóstico de CCR desenvolverão metástases hepáticas, constituindo essa a principal causa de morte para mais de 60% destes doentes. O objetivo deste estudo foi a partir de uma coorte de doentes com CCR e metástases hepáticas de CCR correlacionar as características primárias do CCR com as características das metástases hepáticas.

Material e Métodos: O presente estudo retrospectivo observacional, incluiu dados clínicos e anatomopatológicos de doentes submetidos a cirurgia hepática curativa por diagnóstico de metástases hepáticas síncronas ou metacronas de CCR, no serviço de cirurgia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, entre janeiro de 2013 e dezembro de 2017. A análise foi feita no SPSS, versão 27, e analisada ao nível de significância de 5%.

Resultados: A amostra selecionada incluiu um total de 77 doentes. No que diz respeito ao tamanho do tumor primário, encontrou-se uma associação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e o padrão de crescimento da metástase ($p=0,002$), verificando-se que, tumores com maiores dimensões dão origem a metástases com um padrão de crescimento não desmoplásico. A invasão linfovascular poderá prever acerca do tipo de metastização ser síncrona ou metacrona ($p=0,043$) revelando neste estudo que quando não se verifica ILV é certo que a metástase deva surgir de forma metácrona enquanto que quando ILV está presente a metástase deverá ser metácrona, com 57,1% de probabilidade. Na ausência de invasão linfovascular, o tempo necessário para aparecimento de metastização foi significativamente maior ($p=0,011$). Para além disso relativamente ao número de metástases este também foi significativamente maior ($p=0,049$) em tumores com ausência de ILV quando comparado com os tumores com ILV. Observou-se ainda que, tendencialmente ($p=0,082$) tumores primários com tipo de infiltrado inflamatório de alto grau têm metástases com um padrão de crescimento mais provavelmente desmoplásico (66,7%) enquanto que os tumores primários onde está presente infiltrado inflamatório de baixo grau influenciam um padrão da metástase hepática mais frequentemente não-desmoplásico (62,5%).

Discussão/Conclusão: Conhecendo a importância da caracterização do padrão de crescimento da metástase no que diz respeito à resposta terapêutica, prognóstico mas também relativamente à sobrevida dos doentes, a possibilidade de prever informações histológicas através do tumor primário constitui uma mais valia na abordagem inicial do

doente. Com este trabalho foi possível provar que existe a possibilidade de através de características do tumor primário (tamanho, localização, ILV e tipo de infiltrado inflamatório) inferir acerca das características da metastização hepática com impacto na doença e no seu tratamento.

Palavras-chave: cancro colo-rectal, metástase, fígado, padrão de crescimento histológico

Abstract

Introduction: Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer in the world, ranking second in terms of mortality. It is estimated that more than 50% of patients diagnosed with CRC will develop liver metastases, which is the main cause of death for more than 60% of these patients. The aim of this study was from a cohort of patients with RCC and liver metastases from RCC to correlate the primary characteristics of RCC with the characteristics of liver metastases.

Material and Methods: The present retrospective observational study included clinical and anatomopathological data of patients undergoing curative liver surgery for diagnosis of synchronous or metachronous liver metastases of CRC, in the surgery department of Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, between January 2013 and December 2017. The analysis was performed in SPSS, version 27, and analyzed at a significance level of 5%.

Results: The selected sample included a total of 77 patients, 24 patients were excluded due to neoadjuvant chemotherapy and one patient due to lack of information. Regarding the size of the primary tumor, a statistically significant association was found between the size of the tumor and the pattern of metastasis growth ($p=0.002$), verifying that larger tumors are more likely to give rise to metastases. with a non-desmoplastic growth pattern. Lymphovascular invasion can predict whether the type of metastasis is synchronous or metachronous ($p=0.043$) revealing in this study that when ILV is not observed, it is certain that the metastasis must appear metachronously, whereas when ILV is present the metastasis must be metachronous, with 57.1% probability. In the absence of lymphovascular invasion, the time required for metastasis to appear is significantly longer ($p=0.011$), however, regarding the number of metastases, this is also significantly higher ($p=0.049$) when compared to tumors with ILV. It was also observed that ($p=0.082$) primary tumors with a high-grade inflammatory infiltrate type also tend to metastasize more likely with a desmoplastic growth pattern (66.7%) whereas primary tumors where there is an inflammatory infiltrate of low grade influence a more often non-desmoplastic pattern of liver metastasis (62.5%).

Discussion/Conclusion: Knowing the importance that the different patterns of metastasis growth assume, namely regarding the knowledge of the molecular biology of metastasis and conditioning the development and optimization of new opportunities for therapeutic intervention, predicting this information from the primary tumor is an asset. With this work, it was possible to prove that there is a possibility, through the characteristics of the primary tumor (size, location, ILV and type of inflammatory infiltrate)

to be able to infer about the characteristics of liver metastasis with an impact on the disease and its treatment.

Keywords: colorectal cancer, metastasis, liver, histological growth pattern

Lista de abreviaturas, acrónimos e símbolos

ALPPS - do inglês *Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged Hepatectomy*

AJCC - do inglês *American Joint Committee on Cancer*

APC - do inglês *adenomatous polyposis coli*

CCR - cancro colorretal

CEA - do inglês *carcinoembryonic antigen*

EGFR - do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*

H&E - Hematoxilina e eosina

IIQ - Intervalo Interquartil

ILV - Infiltrado Linfovascular

KRAS - do inglês *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

MAPK - do inglês *Mitogen-activated protein kinase*

NRAS - do inglês *Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - do inglês *Protein chain reaction*

PET - Tomografia de emissão de positrões, do inglês *Positron emission tomography*

TC - Tomografia Computorizada

TNM - do inglês *tumor node metastasis*

TP53 - do inglês *Tumour protein 53*

TRG - Grau de regressão de tumoral, do inglês *Tumour regression grade*

Introdução

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro tipo de cancro mais comum no mundo, ocupando o segundo lugar no que diz respeito à mortalidade¹. Este tipo de tumor verifica-se mais incidente em países desenvolvidos, mais especificamente em regiões com alto índice de desenvolvimento humano². Nos últimos anos, com base no aprofundamento do conhecimento relativamente à carcinogénese e às características moleculares do CCR, diferentes fatores contribuíram para o aumento da sobrevivência nomeadamente, a melhoria na sensibilidade dos procedimentos/metodologias de rastreio, diagnóstico e estadiamento; o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas cirúrgicas; bem como o desenvolvimento e otimização dos esquemas de tratamento de radio e quimioterapia³. No entanto, a mortalidade persiste elevada e é mais elevada em doentes com doença avançada, nomeadamente metastática, sendo o fígado o local mais frequente para o aparecimento de tumores secundários, devido à drenagem mesentérica venosa para a veia porta⁴.

O diagnóstico de CCR inclui a avaliação completa e o correto estadiamento nomeadamente através da realização do estudo analítico com contagem de células sanguíneas, estudo da coagulação, avaliação da função renal e hepática assim como o doseamento da albumina e CEA (do inglês *carcinoembryonic antigen*). Relativamente ao estudo imagiológico deve ser realizada colonoscopia, ecografia, tomografia computadorizada (TC) toraco-abdomino-pélvica, ressonância magnética e/ou tomografia de emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*)^{5,6}. Com toda esta informação é definido o estágio do tumor de acordo com a classificação TNM (do inglês *tumor node metastasis*) da *American Joint Cancer Committee/Union for International Cancer Control TNM classification*⁷. Estima-se que mais de 50% dos doentes com diagnóstico de CCR desenvolverão metástases hepáticas, constituindo essa a principal causa de morte para mais de 60% destes doentes⁴.

Nos últimos anos, surgiram novas modalidades de tratamento para o CCR avançado, e atualmente estão disponíveis diferentes métodos que contribuem para uma abordagem curativa nomeadamente: protocolos de quimioterapia mais eficazes, biomarcadores preditores de resposta da quimioterapia, embolização da veia porta, abordagem cirúrgica de hepatectomia em duas etapas (ALPPS do inglês *Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged Hepatectomy*) e resseção hepática com preservação de parênquima guiada por ecografia⁸⁻¹¹. Porém, independentemente das diferentes abordagens terapêuticas disponíveis, em mais de 50% dos doentes verifica-se recorrência intra-hepática mesmo com a realização de quimioterapia

adjuvante¹². Para além disso, dados de diferentes estudos reportam que cirurgias hepáticas mais agressivas não se correlacionam com aumento da sobrevida, sendo que a realização de quimioterapia neoadjuvante apresenta algumas desvantagens, como o aumento da morbilidade no período pós-operatório^{13,14}. Alguns estudos identificam fatores de pior prognóstico, tais como o tamanho e número das metástases, a distribuição lobar e a progressão tumoral após quimioterapia ou intervalo menor desde a cirurgia do tumor primário. No entanto, estas características, não representam contraindicação absoluta para a realização de cirurgia hepática¹⁵. Um novo fator prognóstico facilmente avaliado foi recentemente identificado - o padrão de crescimento histológico de metástases hepáticas de CCR, existindo estudos que demonstram que diferentes padrões de crescimento influenciam na progressão/resposta tumoral^{16,17}. Os diferentes padrões de crescimento representam a complexidade das interações tumor/hospedeiro traduzindo prováveis respostas de carácter angiogénico ou inflamatório, mas também podem ser consequência das características biológicas do CCR primário. A grande desvantagem é, só é possível ter conhecimento do padrão de crescimento das metástases hepáticas do CCR após ressecção, ou seja, após a cirurgia. A possibilidade de caracterização pré-operatória do padrão de crescimento histológico seria muito interessante e importante, pois permitiria uma terapêutica ajustada às características biológicas e contribuiria para uma decisão cirúrgica adequada, sendo integrada em reuniões multidisciplinares de decisão terapêutica, possibilitando o acompanhamento mais personalizado do doente. Assim, neste trabalho, foi objetivo estudar uma coorte de doentes com CCR e metástases hepáticas de CCR e correlacionar as características primárias do CCR com as características das metástases hepáticas, por forma a identificar características que permitam a previsão do padrão de crescimento histológico das metástases¹⁷.

Material e Métodos

Caracterização da Amostra

O presente estudo retrospectivo observacional incluiu dados clínicos e anatomopatológicos de doentes submetidos a cirurgia hepática por metástase de CCR, com intenção curativa, no serviço de cirurgia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, entre janeiro de 2013 e dezembro de 2017.

Todos os doentes apresentavam metástases hepáticas síncronas ou metácrônicas. Neste estudo foram selecionados no total 77 doentes. Todas as informações biográficas nomeadamente idade (mediana) e género, e clínicas relativas à caracterização do tumor primário entre elas tamanho, histologia/morfologia, localização, classificação TNM de acordo com a classificação de tumores malignos da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*¹⁸, número de gânglios excisados, invasão linfovascular (ILV), invasão neural, presença de infiltrado inflamatório, tipo de infiltrado, tipo de estroma, caracterização molecular e grau de regressão tumoral após quimioterapia neoadjuvante foram obtidas. A caracterização das metástases foi realizada considerando, o número de metástases e o padrão de crescimento.

Todas as informações foram obtidas a partir da consulta do processo clínico após aprovação pela comissão de ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC-137-20), obedecendo aos princípios da Declaração de Helsínquia.

Análise anatomopatológica

O estudo anatomopatológico foi realizado com recurso ao tecido de CCR disponível em blocos de parafina de amostras cirúrgicas. As amostras foram analisadas recorrendo à coloração hematoxilina e eosina (H&E). A revisão histopatológica foi cega, sem conhecimento prévio dos dados do doente ou resultado. A localização do tumor foi definida de acordo com o relatório anatomopatológico, sendo dicotomizada em lado direito e lado esquerdo, quando o tumor se localizava proximal ou distalmente ao ângulo esplénico, respectivamente¹⁹. O grau de diferenciação foi estabelecido de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) como bem diferenciado (G1) até indiferenciado (G4)²⁰. O padrão de crescimento histológico do tumor primário foi definido de acordo com os critérios de Koelzer e Lugli²¹ como: crescimento tumoral infiltrativo em que ocorre invasão das estruturas da parede intestinal por tecido tumoral

com resposta estromal desmoplásica pequena ou ausente; e crescimento tumoral expansivo em que ocorre clara demarcação da frente invasiva do tumor e do tecido hospedeiro. O tumor *budding* foi classificado de acordo com as recomendações do consenso de Lugli *et al.*⁷: seleção da lâmina H&E com maior grau de *budding* na frente invasiva e identificação do "hotspot" em 10 campos na frente invasiva numa ampliação de 10x. Tumor buds foram então contados no "ponto quente" numa ampliação de 20x e o resultado final expresso como baixo *budding* (Bd1), *budding* intermédio (Bd2) e *budding* elevado (Bd3).

A resposta inflamatória também foi avaliada na margem invasiva do tumor de acordo com os critérios de Klintrup K *et al.*²²: baixo grau (ausência ou infiltrado inflamatório moderado) e alto grau (infiltrado inflamatório moderado ou grave, com destruição do tumor).

O tipo de estroma associado ao CCR também foi caracterizado, de acordo com o definido por Ueno H *et al.*²³ em três categorias: imaturo, intermediário ou maduro com base na existência de estroma mixóide ou colagénio do tipo queloide no estroma tumoral, em lâminas coradas com H&E. O estroma mixóide é definido como um estroma com uma substância mucinosa amorfa, tipicamente composta por um material extracelular vacuolado e ligeiramente basófilo ou anfófilo nas fibras de colágeno. O colagénio de tipo queloide é caracterizado por feixes espessos hialinizados de colágeno hipocelular com hialinização. Os tumores com estroma mixóide foram designados como imaturos. No caso de não existir estroma mixóide que preenchesse os critérios para reação desmoplásica imatura, a reação desmoplásica foi designada como intermediária ou madura, dependendo se o estroma fibrótico continha colagénio do tipo queloide ou não, respectivamente. Tipicamente, a reação desmoplásica madura é composta por fibras de colagénio maduras finas estratificadas em várias camadas em todas as zonas fibrosas reativas. As áreas de estroma ao redor de abscessos microscópicos não foram consideradas na análise.

Nos doentes submetidos a quimioterapia neoadjuvante para as metástases hepáticas foi avaliado o grau de regressão de tumoral (TRG). O TRG consiste numa escala ordinal usada para estimar a resposta à terapêutica neoadjuvante na peça cirúrgica. Neste estudo foi adotada a escala Rubbia-Brandt *et al.*⁴. A escala inclui 5 graus: TRG5 caracterizado pela ausência de resposta tumoral; TRG4 caracterizado pela existência de tumor viável em cerca de 75%; TRG3 caracterizado pela existência de tumor viável em cerca de 50%; TRG2 caracterizado pela existência de tumor viável em

cerca de 25% e na periferia da lesão; e TGR1 caracterizado pela ausência de tumor viável²⁵.

Relativamente às características moleculares foi incluído o estudo da instabilidade/estabilidade de microssatélites por imuno-histoquímica, e a avaliação da presença de mutações nos genes *KRAS* (do inglês, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *NRAS* (do inglês, *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*) e *BRAF* por reacção em cadeia da polimerase (PCR do inglês protein chain reaction). Em relação à análise das amostras das metástases hepáticas do CCR, foi avaliado o padrão de crescimento na periferia tumoral da metástase hepática, conforme descrito por Van den Eyden *et al.*²⁶: padrão de crescimento desmoplásico quando a metástase apresenta borda de tecido conjuntivo entre o tecido e o parênquima hepático; padrão de crescimento expansivo quando as placas de células do fígado na interface são comprimidas pelo tumor; e padrão de crescimento de substituição quando as células tumorais infiltradas substituem os hepatócitos nas placas de células hepáticas. O padrão deve representar mais de 75% da interface. Em casos de dois padrões diferentes, cada um apresentando mais de 25% da frente invasiva do tumor, o padrão de crescimento é designado de padrão misto¹⁶. O padrão de crescimento foi ainda dicotomizado como desmoplástico *versus* não desmoplástico, refletindo o seu comportamento biológico²⁷.

Todas as lâminas foram observadas recorrendo a um microscópio de luz - Nikon Eclipse 50i, sendo as imagens obtidas utilizando uma câmara Nikon-Digital Sight DS-Fi1.

Análise estatística

A amostra foi caracterizada através da apresentação da média com desvio-padrão – média (DO) - e da mediana com os quartis da distribuição – Mediana [Q1, Q3] - quando as variáveis eram quantitativas e das frequências absolutas e relativas – n (%) - quando eram qualitativas. Compararam-se as características quantitativas das metástases ou dos tumores primários entre categorias das variáveis qualitativas, respetivamente, dos tumores primários e metástases usando os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis, consoante se comparavam 2 grupos ou pelo menos 3 grupos de categorias. A associação entre variáveis categóricas realizou-se através do teste exato de Fisher e entre variáveis quantitativas através do coeficiente de correlação de Spearman. A opção por testes não paramétricos baseou-se na falta de ajuste das distribuições quantitativas amostrais a distribuições normais, tendo este pressuposto

sido avaliado pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise foi feita no SPSS, versão 27, e analisada ao nível de significância de 5%.

Resultados

Caracterização da amostra

A amostra selecionada incluiu um total de 77 doentes (Anexo I), 29 doentes do género feminino (37,7%) e 48 do género masculino (62,3%), apresentado à data do diagnóstico do tumor primário uma mediada de idade de 66,5 anos [Intervalo interquartil (IIQ) 59-73,8]. O tempo médio de diagnóstico entre tumor primário e metástases foi de $6,07 \pm 10,59$ meses, tendo variado de 13 a 53 meses.

Quando analisada a amostra, no que diz respeito à caracterização do tumor primário a localização verificou-se ser predominante (68,9%) na porção sigmóide do cólon e no reto. Assim, e assumindo a divisão entre cólon direito e cólon esquerdo a localização do tumor primário verificou-se ser predominantemente à esquerda (76,6%). O tamanho do tumor primário na amostra apresentou um valor de mediana de 4 (IQ 2,5-5,8) assumindo um valor mínimo de 2 e máximo de 15 cm.

A abordagem terapêutica do CCR é baseada no estágio da doença existindo diferentes fatores que condicionam nomeadamente a invasão da parede intestinal pelo tumor, a existência de envolvimento de gânglios linfáticos regionais e a presença de metástases à distância. Assim, é possível a distinção entre CCR inicial e localizado e CCR avançado. De acordo com a classificação TNM a maior percentagem de amostras analisadas verificou-se estar caracterizadas como T3 (62,3%) ou seja, maior parte dos tumores primários diagnosticados foram caracterizados como localmente avançados. Relativamente à tipo histológico 79,2% dos tumores analisados foram classificados como adenocarcinoma e os restantes em adenocarcinoma com áreas de produção de muco (7,8%), adenocarcinoma micropapilar (1,3%), adenocarcinoma mucinoso (2,6%), adenocarcinoma serreado (1,3%) e adenocarcinoma micropapilar (1,3%). No que diz respeito ao grau de diferenciação tumoral, verificou-se que 63,6% das amostras analisadas apresentam-se moderadamente diferenciadas e 3,9% apresentam-se pouco diferenciadas.

Do total da amostra 68,8% não realizou quimioterapia neoadjuvante. Relativamente aos 31,2% que realizou terapêutica neoadjuvante para o CCR primário verificou-se regressão tumoral (TRG de Ryan modificado) em todos os doentes, nomeadamente: TRG1 em 16,7% dos doentes, TRG2 em 45,8% dos doentes e TRG3 em 37,5% dos doentes. A análise histológica do tumor primário relativamente ao padrão de crescimento observou-se que 62,3% das amostras analisadas apresentava um padrão infiltrativo e 22,1% um padrão expansivo. No que diz respeito à ILV a análise

histológica revelou que 89,6% dos tumores excisados apresentavam ILV. A análise do *tumor budding* demonstrou que a maioria das amostras (58,4%) apresentava somente a presença de até quatro grupo de células (*buds*) na frente do tumor – Bd1. Quando relacionado o padrão de crescimento do tumor primário com o grau de *budding* observaram-se diferenças com significado estatístico ($p=0,025$) sendo que nas amostras com padrão de crescimento expansivo é mais frequente grau de *budding* 1, enquanto que nas amostras com padrão de crescimento infiltrativo é mais frequente grau de *budding* 2 e 3. Para além disso observou-se que quando correlacionado o valor de *budding* com o grau de diferenciação tumoral observaram-se diferenças com significado estatístico ($p=0,027$) ou seja em amostras com grau de diferenciação moderado é mais frequente um valor de *budding* de 1 e em amostras pouco diferenciadas é mais frequente um valor de *budding* de 2 ou 3.

A análise do infiltrado inflamatório revelou que maioritariamente as amostras apresentaram infiltrado inflamatório do tipo ligeiro (29,9%) e moderado (31,2%), verificando-se que não existem diferenças quando o tipo de infiltrado inflamatório é dividido em baixo (45,5%) e alto (42,9%) grau.

A caracterização do tipo de estroma demonstrou que não existe diferença entre o tipo de estroma presente nas amostras, nomeadamente imaturo (42,9%) e maduro (45,5%). A avaliação molecular das amostras, incluindo o estudo da instabilidade/estabilidade de microssatélites por imuno-histoquímica, demonstrou que 10,4% das amostras apresentam estabilidade de microssatélites. A avaliação da presença de mutações nos genes *KRAS* e *NRAS* revelou que 45,5% das amostras estudadas não apresentam mutações, sendo que 32,5% das amostras estudadas apresentam. A avaliação da mutação do gene *BRAF* foi realizada em 16,9% das amostras, verificando-se que a maioria das amostras (14,3%) não apresenta alterações na expressão deste gene.

Aquando da excisão do tumor primário o número de gânglios excisados encontra-se entre 4 e 71 ($21,45 \pm 14,71$), tendo-se verificado após análise histopatológica a presença de disseminação do tumor primário em média em 4,26 gânglios (média \pm desvio padrão $4,26 \pm 6,57$; mínimo 0, máximo 49). No que diz respeito à classificação TNM em particular à extensão aos gânglios linfáticos na amostra verificou-se, aquando do diagnóstico do tumor primário que 74% dos tumores primários excisados possuíam pelo menos 1 gânglio com disseminação neoplásica verificando-se uma predominância em estágio N2 ou seja, existia disseminação em mais de 4 gânglios excisados.

Relativamente à metastização a maioria os doentes (59,7%) apresentaram metástases síncronas em detrimento de metástases metácronas (40,3%). No que diz respeito ao número de metástases, verificou-se em média cerca de 3 metástases (média \pm desvio padrão $2,79\pm 2,52$; mínimo 1, máximo 14), na maioria dos doentes (71,4%) caracterizadas como unilobares. O diâmetro maior das lesões secundárias encontradas verificou-se estar entre 0,2 e 7,5 cm (média \pm desvio $2,75\pm 1,71$). A análise histológica revelou que o padrão e crescimento predominante observado foi o padrão desmoplásico em 44,2% das amostras e o padrão infiltrativo em 27,3% das amostras.

As características moleculares do tumor são condicionantes que têm grande impacto no diagnóstico, terapêutica e prognóstico. A percentagem de amostras com presença de mutações nos genes *KRAS* e *NRAS* assim como do gene *BRAF* revelou estar de acordo com o descrito na literatura referindo 30-45% para a expressão de *KRAS* e cerca de 10% para o gene *BRAF*²⁸. Nesta amostra verificou-se que a localização do tumor primário tem influência nas características moleculares, ou seja na expressão do gene *KRAS* tendo-se observado que existe uma diferença com significado estatístico ($p=0,006$) ou seja verificou-se que é mais frequente a expressão *KRAS wild-type* nas localizações cólon ascendente e ângulo hepático enquanto a expressão de genes mutados é mais frequente nas restantes localizações do tumor primário, ou seja no cego, cólon transversal, ângulo esplênico, cólon sigmoide e reto. Quando a divisão é feita em cólon direito e cólon esquerdo avaliando a expressão de *KRAS*, observou-se que a expressão *wild-type* do gene *KRAS* é significativamente superior ($p=0,001$) no cólon direito e a expressão mutada mais frequente no cólon esquerdo.

No que diz respeito à realização de quimioterapia neoadjuvante e ao tipo de estroma apresentado verificaram-se diferenças com significado estatístico ($p=0,045$). Demonstrou-se que a realização de terapêutica está associada à presença de um estroma maduro enquanto que a ausência de realização de tratamentos de quimioterapia está associada a um estroma imaturo. Também quando avaliada a associação entre o grau de regressão tumoral e o padrão de crescimento do tumor primário verificou-se que significativamente ($p=0,037$) o padrão desmoplásico está mais associado aos graus de regressão tumoral 1 e 3 e o padrão não desmoplásico está mais associado ao grau 2 de regressão tumoral.

Dado o objetivo do trabalho, ou seja, correlacionar as características primárias do CCR com as características das metástases hepáticas foram avaliadas as possíveis correlações entre os diferentes parâmetros. Assim, da amostra inicial de 77 doentes foram desconsiderados 24 doentes por realização de quimioterapia neoadjuvante e um

doente por ausência de informação, constituindo uma coorte final de 53 doentes (Anexo II).

No que diz respeito à localização do tumor primário e a sua influência no tipo de metástase hepática unilobar ou bilobar os dados revelaram que tendencialmente quando a localização é do tumor primário é no ângulo esplénico (100%), ângulo hepático (100%), ascendente (87,5%), sigmoide (90,5%) a metastização verifica-se ser unilobar, enquanto que quando a localização preferencial do tumor primário é na zona retosigmoide (100%) ou no cólon transverso (66,7%) a metastização tendencialmente é bilobar. No que diz respeito ao tamanho do tumor primário, encontrou-se associação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e o padrão de crescimento da metástase ($p=0,002$), verificando-se que tumores com maiores dimensões é mais provável (68,4%) que deem origem a metástases com um padrão de crescimento não desmoplásico (Figura 1).

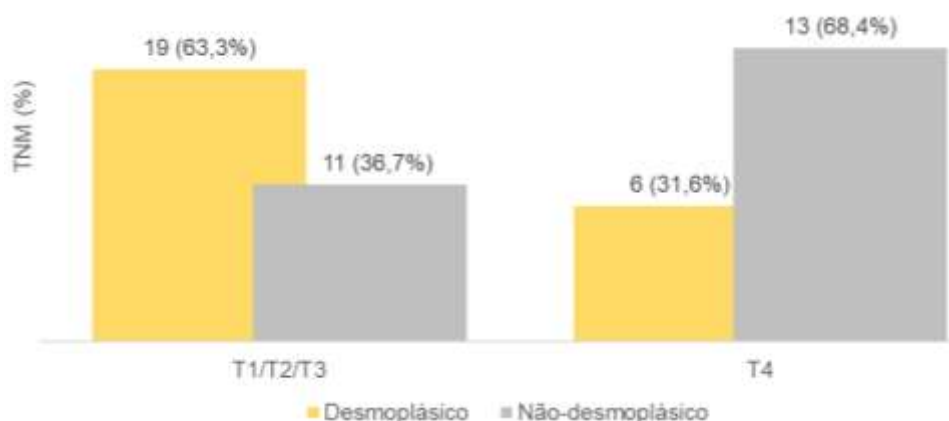


Figura 2 – Gráfico representativo da distribuição da amostra tendo em conta o tamanho do tumor primário e o padrão de crescimento da metástase.

A ILV poderá prever acerca do tipo de metastização ser síncrona ou metacrona ($p=0,043$) revelando neste estudo que quando não se verifica ILV é certo que a metástase deva surgir de forma metácrona enquanto que quando ILV está presente a metástase deverá ser síncrona, com 57,1% de probabilidade. Na ausência de ILV, o tempo necessário para aparecimento de metastização é significativamente maior ($p=0,011$). Relativamente ao número de metástases este é significativamente maior ($p=0,049$) nos tumores sem ILV comparativamente com os tumores com ILV. Observa-se ainda que tendencialmente ($p=0,082$) tumores primários com tipo de infiltrado inflamatório de alto grau têm metástases mais provavelmente com um padrão de crescimento desmoplásico (66,7%) enquanto que os tumores primários onde está

presente infiltrado inflamatório de baixo grau influenciam um padrão da metástase hepática mais frequentemente não-desmoplásicos (62,5%) (Figura 2).

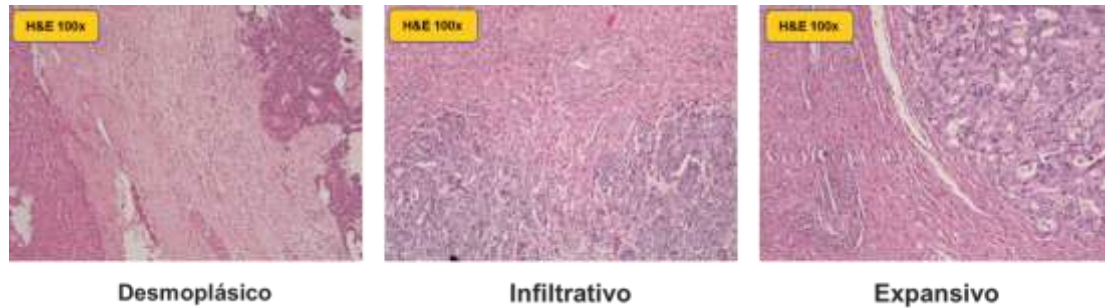


Figura 1 – Imagens representativas dos diferentes padrões de crescimento de amostras de metástases hepáticas de carcinoma colo-rectal.

Fica por demonstrar a significância estatística no que diz respeito à comparação entre o tamanho do tumor e o tempo necessário para o aparecimento de metastização ($p=0,054$) ainda que metade dos tumores com maior tamanho (T4) o tempo para aparecimento de metastização seja superior a 8,9 meses enquanto que para os restantes estádios T o tempo correspondente seja de 5,8 meses.

Discussão

O processo de carcinogénese do CCR é multifatorial e complexo. Para além das mutações genéticas que normalmente precedem a alteração maligna, as vias epigenéticas possuem também um papel preponderante. O completo entendimento de todo o processo, ainda por alcançar, e que inclui diferentes intervenientes possui um papel crucial no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas²⁹.

De acordo com a bibliografia tem-se verificado um declínio da incidência de CCR em grupos etários mais velhos, coincidindo com o aumento da incidência em indivíduos mais jovens. Assim, a mediana de idade do diagnóstico diminuiu de 72 anos para os 66 anos mantendo-se a semelhança de incidência em ambos os géneros, o que vai de encontro à amostra estudada³⁰. No que diz respeito à localização do tumor primário, a amostra estudada revelou uma predominância de tumores estudados no cólon esquerdo, ou seja, no cólon distal, o que não está de acordo com a literatura, já que a incidência é mais elevada para tumores no cólon proximal e mais baixa para os localizados no cólon distal. Metade de todos os CCRs em indivíduos com 65 anos ou mais ocorrem no cólon proximal, no entanto, em indivíduos com idade inferior a 50 anos, os tumores retais são mais comuns, seguidos pelos tumores localizados no cólon distal³⁰. Dependendo da localização, o CCR apresenta evolução diferente condicionando a sobrevida global. A diferença pode ser atribuída à localização anatómica e de desenvolvimento, ou a fatores que participem na carcinogénese, como diferenças na flora bacteriana distinta nos dois lados do cólon, a exposição a nutrientes e ácidos biliares distintos, ou até mesmo a combinação de ambos³¹. Assim, e considerando a amostra constituída unicamente por tumores com metastização hepática existem dados na literatura que apontam para uma maior probabilidade de metastização hepática e pulmonar em tumores CCR localizados à esquerda, o que vai de encontro às características da amostra apresentada já que todos os indivíduos incluídos apresentavam metastização hepática e maioritariamente os tumores primários localizavam-se à esquerda^{32,33}.

O CCR é um tumor que de acordo com o processo de carcinogénese pode ter origem familiar ou esporádica. A forma esporádica, constitui cerca de 70% da incidência na população em geral, e não apresenta qualquer predisposição familiar ou hereditária surgindo como consequência da idade e dos fatores ambientais³⁴. Assim, e de acordo com Fearon e Vogelstein (1990), a forma esporádica de CCR pode resultar da ativação mutacional de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais, mutações somáticas em pelo menos quatro ou cinco genes de uma célula e/ou da acumulação de

múltiplas mutações genéticas^{34,35}. As alterações descritas são sequenciais e cumulativas em genes chave reguladores do crescimento, tais como *KRAS*, *TP53* (do inglês *Tumour Protein 53*), *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli*), *P16* (do inglês *Protein 16*), que participam no processo de carcinogénese. Estes genes são responsáveis pela expressão de proteínas que integram vias de sinalização importantes e que contribuem para o desenvolvimento de 85% de tumores CCR^{35,36}. A via de sinalização do *EGFR* (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*) é uma das vias com bastantes estudos publicados no CCR, verificando-se que mutações nos genes *NRAS*, *KRAS*, e *BRAF* estão descritas em mais de 50% dos casos³⁷. Desta forma, a identificação de mutações nestes genes atualmente já faz parte do algoritmo de terapêutica. Na amostra estudada verificou-se a existência de uma diferença significativa entre a expressão do gene *KRAS* e a localização do tumor primário, observando-se que as amostras dos tumores localizados à direita tinham preferencialmente a expressão *wild-type* do gene e as amostras dos tumores localizados à esquerda tinham a expressão mutada. Em doentes com mutações do gene *RAS* sabe-se que ocorre uma ativação constitucional da via de sinalização *MAPK* (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*), o que induz uma resistência a fármacos como o cetuximab e panitumab³⁸. No entanto, existem também referências a estudos com doentes com CCR metastático caracterizados relativamente à expressão de *KRAS* como *wild-type* que beneficiaram do tratamento anti-EGFR e, em seguida, desenvolveram resistência³⁹. Desta forma é cada vez mais importante o incentivo para aprofundar o estudo de vias de sinalização que podem ser complementares às conhecidas ou alternativas no desenvolvimento de novas moléculas para tratamento.

Nos tumores submetidos a quimioterapia neoadjuvante verificou-se que em mais de 50% das amostras se verificou regressão completa ou quase completa, o que está de acordo com a bibliografia já que diferentes autores apontam para resposta melhor dos tumores localizados à esquerda comparativamente com os tumores localizados à direita³¹.

Atualmente os critérios para terapêutica e avaliação de prognóstico e recorrência do CCR baseiam-se principalmente na informação anatomopatológica ou seja na caracterização TNM⁴⁰. No que diz respeito à análise histológica do tumor, foram avaliados diferentes parâmetros tais como, o tamanho do tumor, grau histológico, a invasão perineural e ILV, o *budding*, o tipo de estroma, a presença e o tipo de infiltrado inflamatório, o grau de regressão tumoral, o número de gânglios ressecados e também o número de gânglios invadidos.

A percentagem de formação de glândulas constitui o parâmetro que classifica o CCR em baixo e alto grau. De acordo com a Organização Mundial de Saúde tumores com formações glandulares que constituam menos de 50% do volume são identificados como de alto grau²⁰. O grau de diferenciação tumoral representa um fator de risco independente para envolvimento ganglionar. A ILV constitui a etapa inicial para a existência de metástases linfáticas, constituindo um fator de prognóstico para diferentes tipos de tumor⁴¹. Além do crescimento direto, pode ocorrer disseminação das células pela via sanguínea, linfática e também ao longo dos nervos. A invasão perineural, à semelhança da ILV neural está igualmente identificada como um fator de mau prognóstico verificando-se estar associada a pior sobrevivência global e não à presença de ILV. De acordo com alguns estudos a invasão neural pode constituir um fator a ter em conta no tratamento com quimioterapia adjuvante⁴⁰. Na amostra estudada não foram encontradas diferenças com significado estatístico relacionando estas variáveis.

No que diz respeito ao tumor *budding*, ou seja, à presença de conjuntos de células tumorais isoladas ou agregados com menos de cinco células tumorais, localizadas na frente invasora da amostra do tumor, este parâmetro está descrito como um fator de prognóstico no CCR. Diferentes estudos apontam para a sua associação com a invasão linfática verificando-se um maior risco de metástase linfática e um pior prognóstico no que diz respeito à probabilidade de recorrência, sobrevivência global e metastização à distância⁴². Estudos anteriores indicam que os *tumor buds* podem adotar propriedades de células em transição epitélio-mesênquima admitindo uma maior capacidade de invasão e de migração⁴². Para além disso estudos apontam para o facto de que em doentes em estágio IV a presença de *budding* intrametastático ou perimetastático poderá constituir um parâmetro que pode auxiliar na estratificação de doentes para as diferentes opções terapêuticas⁴³.

A grande causa de morte nos doentes com diagnóstico de CCR é doença disseminada. Cerca de dois terços dos com CCR desenvolvem recorrência à distância. O fígado é o órgão mais comum de ocorrência de doença metastática no CCR. Quando as células tumorais escapam do local primário através da corrente sanguínea o local mais provável onde ficarão alojadas é o fígado. Cerca de 25% dos doentes apresentam doença síncrona e cerca de 70% dos doentes desenvolvem metástases hepáticas metácrônicas⁴⁴. Embora a sobrevida global de doentes com CCR metastático fosse baixa há cerca de três décadas, houve uma melhoria significativa nos últimos anos. Apesar da inovação ao nível de tratamentos assim como o aprofundamento na compreensão do comportamento biológico do tumor, muito ainda há a fazer. Vários estudos

retrospectivos publicados, em que analisaram coortes de doentes com metástases hepáticas, identificaram fatores de pior prognóstico tais como o tamanho da maior lesão, o número de lesões e a resposta após quimioterapia ou intervalo de tempo desde a ressecção do tumor primário¹⁵. No entanto, importa referir que nenhum destes fatores constitui uma contraindicação para cirurgia hepática e não traduz a interação tumor/hospedeiro, um aspeto fundamental a ter em conta na personalização da terapêutica. Para além disso interessa ainda acrescentar que cirurgias hepáticas mais agressivas não se traduzem em sobrevivência aumentada e a realização de quimioterapia neoadjuvante está associada a um aumento importante da morbilidade pós-operatória^{13,45}. Neste contexto, surgiu um dos objetivos deste trabalho, correlacionar as características histológicas do tumor CCR primário com as características histológicas das metástases hepáticas com o propósito de contribuir para uma abordagem personalizada do doente. Nesta coorte verificou-se também que existe uma tendência para que características como a localização do tumor primário influenciem o tipo de metástase lobar ou bilobar e o facto de se verificar ILV é um fator que influencia o facto da metastização ser síncrona ou metácrona. No CCR primário, fatores histológicos como invasão venosa extramural, crescimento perineural, invasão linfática, angioinvasão, padrão de crescimento difuso e metastização síncrona têm sido associados a piores resultados de sobrevida⁴⁶. Desta forma, o facto do aparecimento de metastização síncrona estar associado à observação de ILV poderá constituir um fator de pior prognóstico^{47,48}.

No que diz respeito à caracterização do padrão de crescimento da metástase existem alguns estudos que defendem que o padrão de crescimento tem implicações prognósticas e clínicas relevantes, verificando-se influência também na sobrevida dos doentes, mas também na resposta ao tratamento com quimioterapia enfatizando por isso a sua importância⁴⁹. Desta forma a utilização deste parâmetro histológico na prática clínica deveria ser uma realidade. Neste estudo provámos que tumores primários mais pequenos e a presença de infiltrado inflamatório de alto grau se associam a um padrão desmoplásico. Conhecendo a importância que os diferentes padrões de crescimento da metástase assumem, nomeadamente acerca do conhecimento da biologia molecular da metástase, o desenvolvimento e otimização de novas oportunidades de intervenção terapêutica tendo como base esta informação do tumor primário constitui uma mais valia⁵⁰.

Conclusão

As orientações da ESMO para os doentes com diagnóstico de CCR metastizado destacam a importância de uma abordagem multidisciplinar que inclui especialidades como a oncologia, cirurgia, imagiologia e a anatomia patológica¹⁰. Os biomarcadores mais utilizados na prática clínica são moleculares, e incluem o *RAS*, o *BRAF* e MSI. No que diz respeito às características histopatológicas atuais são incluídas a dimensão da metástase, a percentagem de necrose e de fibrose, a possibilidade (estado) de ressecção e o grau de regressão tumoral⁴². No entanto, conseguir antever informação acerca da metastização com base em informações do tumor primário seria de extremo valor e constituiria uma mais valia na abordagem inicial do doente com diagnóstico de CCR.

Com este trabalho foi possível provar que existe a possibilidade de, através de características do tumor primário (tamanho, localização, ILV e tipo de infiltrado inflamatório), conseguir inferir acerca das características da metastização hepática com impacto na doença.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão, orientador deste trabalho, por todo o apoio e ensinamentos prestados essenciais na realização deste projeto, e pelo constante estímulo durante todo o meu percurso académico.

Ao Doutor Rui Caetano Oliveira, co-orientador deste trabalho, pelo apoio, disponibilidade e orientação científica.

À Professora Doutora Bárbara Oliveiros pelos ensinamentos e ajuda no tratamento estatístico dos dados.

À Dr.^a Maria Augusta Cipriano, diretora do Serviço de Anatomia Patológica pela confiança e disponibilidade do serviço no acesso à informação.

Aos doentes pelo seu contributo em favor da ciência e também de outros doentes.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, diretora do Instituto de Biofísica, agradeço o apoio, a confiança e o facto de me ter proporcionado todas as condições para a concretização deste trabalho.

A todos os elementos do Instituto de Biofísica pelo apoio e incentivo.

À minha família pela compreensão, incentivo e apoio constantes, sempre de forma incondicional.

Referências Bibliográficas

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
2. Arnold, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut* **66**, 683–691 (2017).
3. Jiang, Y. *et al.* Global pattern and trends of colorectal cancer survival: a systematic review of population-based registration data. *Cancer Biol Med* (2021). doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0634
4. Zarour, L. R. *et al.* Colorectal Cancer Liver Metastasis: Evolving Paradigms and Future Directions. *CMGH* (2017). doi:10.1016/j.jcmgh.2017.01.006
5. Argilés, G. *et al.* Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **31**, 1291–1305 (2020).
6. Van Cutsem, E., Cervantes, A., Nordlinger, B., Arnold, D. & ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **25 Suppl 3**, iii1-9 (2014).
7. Lugli, A. *et al.* Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod. Pathol.* **30**, 1299–1311 (2017).
8. Jones, R. P. *et al.* Colorectal Liver Metastases: A Critical Review of State of the Art. *Liver Cancer* **6**, 66–71 (2017).
9. Torzilli, G. *et al.* Surgery of Colorectal Liver Metastases: Pushing the Limits. *Liver Cancer* **6**, 80–89 (2017).
10. Van Cutsem, E. *et al.* ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* (2016). doi:10.1093/annonc/mdw235
11. Yoshino, T. *et al.* Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO–ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann. Oncol.* **29**, 44–70 (2018).

12. Jones, R. P. *et al.* Systematic review and meta-analysis of follow-up after hepatectomy for colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery* **99**, 477–486 (2012).
13. Mise, Y. *et al.* Parenchymal-sparing hepatectomy in colorectal liver metastasis improves salvageability and survival. *Ann. Surg.* **263**, 146–152 (2016).
14. Martins, J. *et al.* Sinusoidal dilation increases the risk of complications in hepatectomy for CRCLM - Protective effect of bevacizumab and diabetes mellitus, serum gamma-glutamyltranspeptidase as predictive factor. *Eur. J. Surg. Oncol.* **42**, 713–721 (2016).
15. Jang, K. U. *et al.* Prognostic factors in terms of the number of metastatic nodules in patients with colorectal cancer liver metastases. *Ann. Coloproctol.* **32**, 92–100 (2016).
16. Vermeulen, P. B. *et al.* Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *J. Pathol.* **195**, 336–342 (2001).
17. Falcão, D. *et al.* Histopathologic patterns as markers of prognosis in patients undergoing hepatectomy for colorectal cancer liver metastases – Pushing growth as an independent risk factor for decreased survival. *Eur. J. Surg. Oncol.* **44**, 1212–1219 (2018).
18. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more ‘personalized’ approach to cancer staging. *CA. Cancer J. Clin.* **67**, 93–99 (2017).
19. Mukund, K., Syulyukina, N., Ramamoorthy, S. & Subramaniam, S. Right and left-sided colon cancers - specificity of molecular mechanisms in tumorigenesis and progression. *BMC Cancer* **20**, 1–15 (2020).
20. Nagtegaal, I. D. *et al.* The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* **76**, 182–188 (2020).
21. Koelzer, V. H. & Lugli, A. The Tumor Border Configuration of Colorectal Cancer as a Histomorphological Prognostic Indicator. *Front. Oncol.* **4**, 29 (2014).
22. Klintrup, K. *et al.* Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **41**, 2645–2654 (2005).
23. Ueno, H. *et al.* Prognostic value of desmoplastic reaction characterisation in stage

- II colon cancer: prospective validation in a Phase 3 study (SACURA Trial). *Br. J. Cancer* 2021 1246 **124**, 1088–1097 (2021).
24. Rubbia-Brandt, L. *et al.* Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **18**, 299–304 (2007).
 25. Moreno Prats, M., Sasatomi, E. & Stevenson, H. L. Colorectal Liver Metastases: A Pathologist's Guide to Creating an Informative Report and Improving Patient Care. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **143**, 251–257 (2019).
 26. Van Den Eynden, G. G. *et al.* The histological growth pattern of colorectal cancer liver metastases has prognostic value. *Clin. Exp. Metastasis* (2012). doi:10.1007/s10585-012-9469-1
 27. Höppener, D. J. *et al.* Enrichment of the tumour immune microenvironment in patients with desmoplastic colorectal liver metastasis. *Br. J. Cancer* 2020 1232 **123**, 196–206 (2020).
 28. Yari, A. *et al.* Mutation Status and Prognostic Value of KRAS and BRAF in Southeast Iranian Colorectal Cancer Patients: First Report from Southeast of Iran. *J. Gastrointest. Cancer* **52**, 557–568 (2021).
 29. Harrison, S. & Benziger, H. The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *Surgeon* **9**, 200–10 (2011).
 30. Siegel, R. L. *et al.* Colorectal cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 145–164 (2020).
 31. Baran, B. *et al.* Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterol. Res.* **11**, 264–273 (2018).
 32. Vatandoust, S. Colorectal cancer: Metastases to a single organ. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11767 (2015).
 33. Benedix, F. *et al.* Comparison of 17,641 Patients With Right- and Left-Sided Colon Cancer: Differences in Epidemiology, Perioperative Course, Histology, and Survival. *Dis. Colon Rectum* **53**, 57–64 (2010).
 34. Calvert, P. M. & Frucht, H. The genetics of colorectal cancer. *Ann. Intern. Med.* **137**, 603–12 (2002).
 35. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*

- 61**, 759–67 (1990).
36. Agrawal, J. *et al.* *Current Diagnosis & Treatment. Gastroenterology, Hepatology & Endoscopy.* (McGraw Hill Lange™, 2012).
 37. Sepulveda, A. R. *et al.* Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* **35**, 1453–1486 (2017).
 38. Yamashita, S., Chun, Y. S., Kopetz, S. E. & Vauthey, J.-N. Biomarkers in colorectal liver metastases. *Br. J. Surg.* **105**, 618–627 (2018).
 39. Porru, M., Pompili, L., Caruso, C., Biroccio, A. & Leonetti, C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, 57 (2018).
 40. Tu, J. *et al.* Perineural Invasion Is a Strong Prognostic Factor but Not a Predictive Factor of Response to Adjuvant Chemotherapy in Node-Negative Colon Cancer. *Front. Oncol.* **11**, 663154 (2021).
 41. Gao, Z. *et al.* Prognostic value of lymphovascular invasion in stage II colorectal cancer patients with an inadequate examination of lymph nodes. *World J. Surg. Oncol.* **19**, 125 (2021).
 42. Zlobec, I., Berger, M. D. & Lugli, A. Tumour budding and its clinical implications in gastrointestinal cancers. *Br. J. Cancer* **123**, 700–708 (2020).
 43. Ueno, H. *et al.* Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology* **127**, 385–94 (2004).
 44. Engstrand, J., Strömberg, C., Nilsson, H., Freedman, J. & Jonas, E. Synchronous and metachronous liver metastases in patients with colorectal cancer—towards a clinically relevant definition. *World J. Surg. Oncol.* **17**, 228 (2019).
 45. Martins, J. *et al.* Sinusoidal dilation increases the risk of complications in hepatectomy for CRCLM – Protective effect of bevacizumab and diabetes mellitus, serum gamma-glutamyltranspeptidase as predictive factor. *Eur. J. Surg. Oncol.* **42**, 713–721 (2016).
 46. Shirouzu, K., Isomoto, H., Kakegawa, T. & Morimatsu, M. A prospective clinicopathologic study of venous invasion in colorectal cancer. *Am. J. Surg.* **162**, 216–222 (1991).

47. Campanati, R. G., Sancio, J. B., Sucena, L. M. de A., Sanches, M. D. & Resende, V. Primary tumor lymphovascular invasion negatively affects survival after colorectal liver metastasis resection? *ABCD. Arq. Bras. Cir. Dig. (São Paulo)* **34**, (2021).
48. Scherman, P., Syk, I., Holmberg, E., Naredi, P. & Rizell, M. Impact of patient, primary tumor and metastatic pattern including tumor location on survival in patients undergoing ablation or resection for colorectal liver metastases: A population-based national cohort study. *Eur. J. Surg. Oncol.* **47**, 375–383 (2021).
49. Höppener, D. J. *et al.* Histopathological Growth Patterns and Survival After Resection of Colorectal Liver Metastasis: An External Validation Study. *JNCI Cancer Spectr.* **5**, (2021).
50. Barnhill, R. *et al.* Replacement and desmoplastic histopathological growth patterns in cutaneous melanoma liver metastases: frequency, characteristics, and robust prognostic value. *J. Pathol. Clin. Res.* **6**, 195–206 (2020).

Anexo I

Dados amostra total de 77 doentes

| | n | Min - Max | Média (DP) | Mediana [Q1 - Q3] |
|------------------------|----|-----------|-------------|-------------------|
| Idade (anos) | 77 | 42 - 88 | 65,5 (9,9) | 66,5 [59 - 73,8] |
| Tamanho (cm) | 40 | 2 - 15 | 4,3 (2,5) | 4 [2,5 - 5,8] |
| Nº de gânglios (total) | 77 | 4 - 71 | 21,5 (14,7) | 19 [11 - 29,3] |

| Tumor primário | n (%) |
|--------------------------|--------------|
| Localização | |
| Ângulo esplénico | 3 (3,9%) |
| Cólon ascendente | 8 (10,4%) |
| Cego | 4 (5,2%) |
| Cólon descendente | 3 (3,9%) |
| Reto | 24 (31,2%) |
| Sigmoide | 27 (35,1%) |
| Sigmoide e reto | 1 (1,3%) |
| Transição retos-sigmoide | 1 (1,3%) |
| Cólon transversa | 3 (3,9%) |
| Lateralidade | |
| Direita | 18 (23,4%) |
| Esquerda | 59 (76,6%) |
| T | |
| 1 | 1 (1,3%) |
| 2 | 5 (6,5%) |
| 3 | 48 (62,3%) |
| 4a | 20 (26%) |
| 4b | 3 (3,9%) |
| T simplificado | |
| T1 | 1 (1,3%) |
| T2 | 5 (6,5%) |
| T3 | 48 (62,3%) |
| T4 | 23 (29,9%) |
| N | |
| 0 | 20 (26%) |
| 1 | 1 (1,3%) |
| 1a | 10 (13%) |
| 1b | 13 (16,9%) |
| 2 | 2 (2,6%) |
| 2a | 16 (20,8%) |
| N simplificado | |
| N0 | 20 (26%) |
| N1 | 24 (31,2%) |
| N2 | 33 (42,9%) |
| N positivo | |

| | |
|--|------------|
| N0 | 20 (26%) |
| N+ | 57 (74%) |
| TRG | |
| 1 | 4 (5,2%) |
| 2 | 11 (14,3%) |
| 3 | 9 (11,7%) |
| Invasão linfovascular (ILV) | |
| Ausente | 8 (10,4%) |
| Presente | 69 (89,6%) |
| Invasão neural | |
| Ausente | 16 (20,8%) |
| Presente | 60 (77,9%) |
| Padrão de crescimento primário | |
| Infiltrativo | 48 (62,3%) |
| Expansivo | 17 (22,1%) |
| N/A | 12 (15,6%) |
| Budding | |
| Bd1 | 45 (58,4%) |
| Bd2 | 11 (14,3%) |
| Bd3 | 8 (10,4%) |
| N/A | 13 (16,9%) |
| Budding simplificado | |
| Bd1 | 45 (58,4%) |
| Bd2/3 | 19 (24,7%) |
| N/A | 13 (16,9%) |
| Infiltrado inflamatório | |
| Ausente | 12 (15,6%) |
| Ligeiro | 23 (29,9%) |
| Moderado | 24 (31,2%) |
| Severo | 9 (11,7%) |
| N/A | 9 (11,7%) |
| Tipo de infiltrado inflamatório | |
| baixo grau | 35 (45,5%) |
| alto grau | 33 (42,9%) |
| N/A | 9 (11,7%) |
| Tipo de estroma | |
| Imaturo | 33 (42,9%) |
| Maduro | 35 (45,5%) |
| N/A | 9 (11,7%) |
| Grading | |
| 2 | 49 (63,6%) |
| 3 | 3 (3,9%) |
| N/A | 25 (32,5%) |
| Morfologia | |
| Adenocarcinoma | 61 (79,2%) |
| Adenocarcinoma com áreas de produção de muco | 6 (7,8%) |
| Adenocarcinoma micropapilar | 1 (1,3%) |

| | |
|-------------------------|------------|
| Adenocarcinoma mucinoso | 2 (2,6%) |
| Adenocarcinoma serreado | 1 (1,3%) |
| N/A | 5 (6,5%) |
| MMR | |
| MSS | 8 (10,4%) |
| N/A | 69 (89,6%) |
| KRAS | |
| wt | 6 (7,8%) |
| mut | 23 (29,9%) |
| N/A | 48 (62,3%) |
| Status BRAF | |
| wt | 11 (14,3%) |
| N/A | 66 (85,7%) |

N/A – Não avaliado / Não aplicável

Anexo II

Dados amostra de 53 doentes com metastização hepática

| | n | Min - Max | Média (DP) | Mediana [Q1 - Q3] |
|------------------------|----|-----------|-------------|--------------------|
| Idade (anos) | 53 | 43 - 89 | 67 (10,4) | 67,7 [59,7 - 76,3] |
| Tamanho (cm) | 28 | 2 - 15 | 4,9 (2,7) | 4,5 [3 - 6] |
| Nº de gânglios (total) | 53 | 6 - 71 | 24,9 (15,8) | 21 [12,3 - 32,8] |

| Tumor primário | n (%) |
|------------------------------|--------------|
| Localização | |
| Ângulo esplénico | 3 (5,7%) |
| Ângulo hepático | 3 (5,7%) |
| Cólon ascendente | 8 (15,1%) |
| Cego | 4 (7,5%) |
| Cólon descendente | 3 (5,7%) |
| Reto | 5 (9,4%) |
| Sigmoide | 23 (43,4%) |
| Transição reto-sigmoide | 1 (1,9%) |
| Tranverso | 3 (5,7%) |
| Lateralidade | |
| Direita | 18 (34%) |
| Esquerda | 35 (66%) |
| T | |
| 1 | 1 (1,9%) |
| 2 | 1 (1,9%) |
| 3 | 29 (54,7%) |
| 4a | 20 (37,7%) |
| 4b | 2 (3,8%) |
| T simplificado | |
| T1 | 1 (1,9%) |
| T2 | 1 (1,9%) |
| T3 | 29 (54,7%) |
| T4 | 22 (41,5%) |
| N | |
| 0 | 13 (24,5%) |
| 1a | 7 (13,2%) |
| 1b | 12 (22,6%) |
| 2 | 2 (3,8%) |
| 2a | 8 (15,1%) |
| 2b | 11 (20,8%) |
| N | |
| N0 | 13 (24,5%) |
| N+ | 40 (75,5%) |
| Invasão linfovascular | |

| | |
|--|------------|
| Ausente | 4 (7,5%) |
| Presente | 49 (92,5%) |
| Invasão Neural | |
| Ausente | 9 (17%) |
| Presente | 43 (81,1%) |
| Padrão de crescimento primário | |
| Infiltrativo | 41 (77,4%) |
| Expansivo | 11 (20,8%) |
| N/A | 1 (1,9%) |
| Budding | |
| Bd1 | 36 (67,9%) |
| Bd2 | 10 (18,9%) |
| Bd3 | 7 (13,2%) |
| Infiltrado inflamatório | |
| Ausente | 8 (15,1%) |
| Ligeiro | 18 (34%) |
| Moderado | 19 (35,8%) |
| Severo | 7 (13,2%) |
| N/A | 1 (1,9%) |
| Tipo de infiltrado inflamatório | |
| Baixo grau | 26 (49,1%) |
| Alto grau | 26 (49,1%) |
| N/A | 1 (1,9%) |
| Tipo de estroma | |
| Imaturo | 29 (54,7%) |
| Maduro | 23 (43,4%) |
| Sem dados | 1 (1,9%) |
| Grading | |
| 2 | 49 (92,5%) |
| 3 | 3 (5,7%) |
| N/A | 1 (1,9%) |
| Morfologia | |
| Adenocarcinoma | 44 (83%) |
| Adenocarcinoma com áreas de produção de muco | 5 (9,4%) |
| Adenocarcinoma micropapilar | 1 (1,9%) |
| Adenocarcinoma serreado | 1 (1,9%) |
| Micropapilar | 1 (1,9%) |
| N/A | 1 (1,9%) |
| MMR | |
| MSS | 5 (9,4%) |
| N/A | 48 (90,6%) |
| Status RAS (KRAS e NRAS) | |
| mutação p.Gly12Asp | 2 (3,8%) |
| mutação p.Gly12Asp (c.35G>A) | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly12Asp no gene KRAS | 2 (3,8%) |
| mutação p.Gly12Cys (c.34G>T) no gene KRAS | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly12Ser (c.34G>A) no gene KRAS | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly12Val | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly12Val (c.35G>T) | 1 (1,9%) |

| | |
|---|------------|
| mutação p.Gly12Val (c.35G>T) no gene KRAS | 4 (7,5%) |
| mutação p.Gly13Arg (c.37G>C) no gene KRAS | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly13Asp (c.38G>A) | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly13Asp (c.38G>A) no gene KRAS | 1 (1,9%) |
| mutação p.Gly13Cys (c.37G>T) | 1 (1,9%) |
| p.Gln61Leu no gene KRAS | 1 (1,9%) |
| p.Gly12Asp no gene KRAS | 1 (1,9%) |
| <i>Wild-type</i> | 26 (49,1%) |
| N/A | 8 (15,1%) |
| KRAS | |
| Wild-type | 6 (11,3%) |
| Mutado | 19 (35,8%) |
| N/A | 28 (52,8%) |
| BRAF | |
| <i>Wild-type</i> | 7 (13,2%) |
| N/A | 46 (86,8%) |

N/A – Não avaliado / Não aplicável

| | n | Min - Max | Média (DP) | Mediana [Q1 - Q3] |
|----------------------|----|-----------|-------------|--------------------|
| Idade | 53 | 43 - 89 | 67,8 (10,4) | 68,3 [60,3 - 75,9] |
| Número de metástases | 51 | 1 - 10 | 2,5 (1,8) | 2 [1 - 3] |
| Maior diâmetro | 51 | 0 - 8 | 2,6 (1,8) | 2,3 [1,2 - 3,5] |

| Metetástase | n (%) |
|------------------------------|--------------|
| Tipo de metastização | |
| Síncrona | 28 (52,8%) |
| Metácrona | 25 (47,2%) |
| Unilobar vs bilobar | |
| Bilobar | 10 (18,9%) |
| Unilobar | 40 (75,5%) |
| N/A | 3 (5,7%) |
| Padrão de crescimento | |
| Desmoplásico | 25 (47,2%) |
| Expansivo | 6 (11,3%) |
| Expansivo e infiltrativo | 5 (9,4%) |
| Infiltrativo | 13 (24,5%) |
| N/A | 4 (7,5%) |
| Padrão simplificado | |
| Desmoplásico | 25 (47,2%) |
| Não-desmoplásico | 24 (45,3%) |
| N/A | 4 (7,5%) |
| TRG | |
| 1 | 1 (1,9%) |

| | |
|-----|------------|
| 2 | 3 (5,7%) |
| 3 | 5 (9,4%) |
| 4 | 10 (18,9%) |
| 5 | 5 (9,4%) |
| N/A | 29 (54,7%) |

N/A – Não avaliado / Não aplicável

