



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MIGUEL COUTO FERNANDES DE OLIVEIRA

***Fatores de Prognóstico no Colangiocarcinoma Distal Submetido a
Duodenopancreatectomia Cefálica***

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE CIRURGIA GERAL

Trabalho realizado sob a orientação de:

DR. RICARDO JORGE TEIXEIRA MARTINS

DRA. CRISTINA PEREIRA CAMACHO

ABRIL/2021

Fatores de Prognóstico no Colangiocarcinoma Distal Submetido a Duodenopancreatectomia Cefálica

TRABALHO FINAL COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Autores e Afiliações

Miguel Couto Fernandes de Oliveira ¹

Cristina Pereira Camacho ^{1,2}

Rui Pedro Caetano Moreira de Oliveira ^{3,4,5}

Ricardo Jorge Teixeira Martins ^{1,2,4,5,6}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

² Serviço de Cirurgia, CHUC

³ Serviço de Anatomia Patológica, CHUC

⁴ Instituto de Biofísica, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

⁵ iCBR CIMAGO, Centro para a Investigação em Genética, Ambiente e Oncologia, Coimbra

⁶ Unidade de Transplantação Hepática de Adultos, CHUC

Morada Institucional: Serviço de Cirurgia Geral, CHUC. Praceta Professor Mota Pinto, 3004-561 Coimbra

Email do Autor Correspondente (Orientador): Ricardo.Martins@chuc.min-saude.pt

Índice

Resumo	3
Abstract	4
Introdução.....	6
Materiais e Métodos	9
Resultados.....	13
Discussão	21
Conclusão.....	27
Agradecimentos.....	28
Referências Bibliográficas	30
Anexos	35

Resumo

Introdução: O colangiocarcinoma distal (CCD) é um dos três grandes subtipos de colangiocarcinoma. Trata-se de uma neoplasia com um prognóstico muito reservado, mesmo após resseção curativa. Além disto, pela sua raridade, permanece consideravelmente mal caracterizado. Pretendeu-se caracterizar e avaliar o impacto prognóstico de marcadores clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos em doentes com diagnóstico de CCD submetidos a resseção curativa.

Materiais e Métodos: Estudo de coorte retrospectivo, com base numa amostra de 37 doentes com diagnóstico histológico de CCD, submetidos a duodenopancreatectomia cefálica entre 2008 e 2019. Verificou-se uma idade média de 69,19 ($\pm 9,92$) anos, sendo 62,2% dos doentes do sexo masculino. Além da avaliação clínica e patológica, procedeu-se a avaliação imuno-histoquímica para pesquisa de instabilidade de microssatélites e expressão de HER2, CD44, ALDH1 e CD56. Considerando-se significativos valores de $p < 0,05$, procedeu-se a análise de sobrevivência com recurso a curvas de *Kaplan-Meier*, comparação dos resultados através do teste de *log-rank* em análise univariada e regressão de *Cox* para *hazards* proporcionais em análise multivariada.

Resultados: Com um *follow-up* mediano de $14 \pm 23,7$ meses, constatou-se uma sobrevivência global (SG) mediana de $16 \pm 2,8$ meses e uma sobrevivência livre de doença (SLD) mediana de $14 \pm 5,2$ meses. Verificou-se expressão de CD44 e ALDH1, respetivamente, em 34,8% e 26,1% dos doentes. Em análise univariada, a resseção de órgãos adjacentes ($p=0,010$), complicações com grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III ($GCD \geq III$) ($p=0,003$), hemorragia pós-operatória de grau C (HPOGC) ($p=0,030$), fístula biliar ($p < 0,001$), margens de resseção positivas (MR+) ($p=0,006$) e a expressão de CD44 ($p=0,032$) e ALDH1 ($p=0,016$) tiveram impacto na SG. Com impacto na SLD, verificou-se a incidência de HPOGC ($p=0,042$), fístula pancreática de grau C ($p=0,022$) e de deiscência da anastomose gastrojejunal ($p=0,042$). Em análise multivariada, confirmaram-se como fatores independentes com impacto na SG o $GCD \geq III$ (HR=6,64, $p=0,042$), as MR+ (HR=5,81, $p=0,043$), e a expressão de CD44 (HR=0,089, $p=0,033$) e ALDH1 (HR=9,24, $p=0,037$).

Discussão: Além de confirmar o valor prognóstico de marcadores extensamente reconhecidos como tal pela literatura, o estudo demonstra o impacto das complicações pós-operatórias na SG e SLD, bem como a expressão de CD44 e ALDH1 pelo CCD e o seu impacto prognóstico, realçando o importante papel das *cancer stem cells* no CCD.

Conclusão: O presente estudo revelou que $GCD \geq III$, MR+ e a expressão de CD44 e ALDH1 são fatores de prognóstico independentes no CCD. Deverão, portanto, ser considerados na avaliação e estratificação prognóstica dos doentes com CCD submetidos a resseção curativa.

Palavras-Chave: Colangiocarcinoma, Fatores de Prognóstico, Duodenopancreatectomia, Morbidade, Imuno-histoquímica.

Abstract

Introduction: Distal cholangiocarcinoma (dCCA) is one of three subtypes of cholangiocarcinoma. It has a dismal prognosis, even after curative resection, as well as a poor characterization owing to its low incidence. The present study sought to evaluate the prognostic value of clinical, pathological and immunohistochemical markers in patients diagnosed with dCCA, after surgical resection.

Materials and Methods: A retrospective cohort study was conducted, with a sample of 37 patients with histological diagnosis of dCCA, after undergoing pancreaticoduodenectomy, between 2008 and 2019. The patients had an average age of 69.19 (± 9.92) years, being 62.2% of them male. In conjunction with clinical and pathological assessment, immunohistochemical evaluation was carried out to examine the existence of microsatellite instability and expression of HER2, CD44, ALDH1 and CD56. Survival analysis was undertaken with Kaplan-Meier curve analysis, with the results compared with a log-rank test in univariate analysis. A proportional hazards Cox regression was also performed, for multivariate analysis.

Results: After a median follow-up of 14 \pm 23.7 months, the overall survival (OS) was of 16 \pm 2.8 months and the disease free survival (DFS) was of 14 \pm 5.2 months. CD44 and ALDH1 expression was observed in 34.8% and 26.1% of the evaluated tumours, respectively. In univariate analysis, adjacent organ resection ($p=0.010$), a Clavien-Dindo classification $\geq III$ ($CDC \geq III$) ($p=0.003$), grade C post-operative haemorrhage (GCPOH) ($p=0.030$), biliary fistula ($p<0.001$), positive resection margins (R+) ($p=0.006$), and CD44 ($p=0.032$) and ALDH1 ($p=0.016$) expression were found to influence OS. Additionally, GCPOH ($p=0.042$), grade C pancreatic fistula ($p=0.022$) and gastrojejunal fistula ($p=0.042$) were found to influence DFS. In multivariate analysis, $CDC \geq III$ (HR=6.64, $p=0.042$), R+ (HR=5.81, $p=0.043$) and CD44 (HR=0.089, $p=0.033$) and ALDH1 (HR=9.24, $p=0.037$) expression, were established as independent prognostic factors concerning OS.

Discussion: Aside from reinstating the value of prognostic factors extensively recognised as such in literature, the study shows both the impact of post-operative morbidity in OS and DFS,

as well as the expression and prognostic value of CD44 and ALDH1 in dCCA, attesting the important role of cancer stem cells in dCCA.

Conclusion: The current study shows that CDC \geq III, M+ and CD44 and ALDH1 expression have an important influence on OS of dCCA patients. As such, this parameters should be considered in the evaluation and prognostic stratification of patients with dCCA undergoing surgical resection.

Keywords: Cholangiocarcinoma, Prognostic Factors, Pancreaticoduodenectomy, Morbidity, Immunohistochemistry.

Introdução

O colangiocarcinoma é uma neoplasia maligna com origem na árvore biliar. São classificados em três categorias, de acordo com a sua localização anatômica: intra-hepáticos, quando localizados a montante dos ductos biliares de segunda ordem, peri-hilares, quando localizados entre os ductos biliares de segunda ordem e o ducto cístico, e distais, quando localizados a jusante do ducto cístico e a montante da ampola de Vater (1). No seu todo, representam 3% de todas as neoplasias gastrointestinais e, apesar de serem tumores relativamente raros, com uma incidência global anual inferior a 6 novos casos por cada 100 000 habitantes, tem-se verificado um aumento do número de novos casos (2). São tumores agressivos, com uma sobrevivência aos 5 anos após o diagnóstico na ordem dos 7-20% (1). O colangiocarcinoma distal, em específico, representa 20-30% dos casos de colangiocarcinoma (1) e apresenta uma sobrevivência aos 5 anos após o diagnóstico na ordem dos 11% (3).

São neoplasias heterogêneas e complexas, em resultado da sua grande variabilidade genética e epigenética e das múltiplas interações entre células neoplásicas, *cancer stem cells* e microambiente tumoral, o que lhes atribui um comportamento biológico extremamente agressivo (2). É precisamente esta heterogeneidade e agressividade biológica, aliadas à sua apresentação indolente, diagnóstico tardio e múltiplos mecanismos de resistência a terapêuticas convencionais, como a quimioterapia e radioterapia, que conferem aos colangiocarcinomas um prognóstico muito reservado (1, 2).

No atual estado da arte, a ressecção cirúrgica completa permanece como a única modalidade terapêutica considerada curativa (1, 2, 4, 5), que no colangiocarcinoma distal, normalmente, passa por uma duodenopancreatectomia cefálica (1, 4, 5). No entanto, somente um quarto a um terço dos doentes se apresentam em estádios passíveis de uma ressecção curativa no momento do diagnóstico (1, 2, 4). Além disto, mesmo nos doentes que são submetidos a uma ressecção curativa, as taxas de recidiva permanecem elevadas, com uma sobrevivência aos 5 anos após ressecção entre os 27-37% para os colangiocarcinomas distais (4). Destas reduzidas taxas de sobrevivência, surgiu a necessidade de desenvolver e implementar terapêuticas adjuvantes eficazes, tendo sido, pela primeira vez, em 2019, publicada uma *guideline* com recomendações face à instituição de quimioterapia e de quimiorradioterapia em contexto adjuvante no colangiocarcinoma (6). No entanto, apesar da melhoria dos tempos de sobrevivência livre de doença (SLD) e de sobrevivência global (SG) com a instituição das referidas recomendações (7, 8), os benefícios da quimioterapia no colangiocarcinoma são limitados, em resultado dos inúmeros mecanismos de resistência que os colangiocarcinomas apresentam (1). Em conjunto com a elevada incidência de reações

adversas medicamentosas associada à quimioterapia, estas limitações têm motivado a investigação de novas modalidades terapêuticas.

Recentemente, novas modalidades terapêuticas têm emergido, em alguns casos, até implementadas. No entanto, embora apresentem resultados promissores (1, 9-11), ainda não fazem parte da realidade clínica da esmagadora maioria dos centros de tratamento do colangiocarcinoma. A sua implementação está dependente não só da necessidade de um maior nível de evidência científica face à eficácia e segurança da sua utilização, mas também da caracterização de marcadores que permitam a avaliação da aplicabilidade destas modalidades terapêuticas. Em contexto adjuvante, necessitamos de marcadores que, além de avaliar a sua aplicabilidade, permitam aferir o prognóstico, de modo a determinar quais os doentes com maior risco de recidiva e que mais beneficiariam de terapêutica adicional, após resseção curativa. São particularmente importantes marcadores clínicos, como a incidência de morbidade pós-operatória (12), marcadores anatomopatológicos, como o estado das margens de resseção, envolvimento ganglionar e invasão microvascular e perineural (13, 14) e marcadores imuno-histoquímicos, como a expressão de HER2 e a instabilidade de microssatélites, pesquisados sistematicamente em já várias outras neoplasias (15, 16) e marcadores de *cancer stem cells*, mais recentemente verificados como sendo expressos pelos colangiocarcinomas (10, 17).

O colangiocarcinoma distal, em particular, é um subtipo consideravelmente mal caracterizado de colangiocarcinoma. Em resultado da sua reduzida incidência, é, normalmente, estudado em conjunto com os colangiocarcinomas peri-hilares, formando o conjunto conhecido por colangiocarcinomas extra-hepáticos, ou em conjunto com as restantes neoplasias da cabeça do pâncreas, pela sua localização anatómica e abordagem cirúrgica extremamente semelhantes (13). No entanto, cada vez mais são evidentes as diferenças entre os vários subtipos de colangiocarcinoma, mediante a sua localização anatómica, no que é respeitante aos seus padrões histológicos e mesmo perfis mutacionais (1, 2). Efetivamente, os colangiocarcinomas distais são, na sua maioria, adenocarcinomas mucinosos e apresentam perfis genéticos que são, em alguns pontos, mais próximos dos adenocarcinomas pancreáticos e colorretais mucinosos do que dos colangiocarcinomas intra-hepáticos periféricos, que são, maioritariamente, não mucinosos (1, 17). O esclarecimento destas diferenças é imperativo e passa pela caracterização pormenorizada de cada subtipo de colangiocarcinoma. Deste modo, a caracterização do colangiocarcinoma distal é uma lacuna cuja colmatação é fundamental.

Assim sendo, o presente estudo tem por objetivo avaliar o valor prognóstico de marcadores clínicos e anatomopatológicos no colangiocarcinoma distal submetido a

duodenopancreatectomia cefálica e, além disto, avaliar a expressão de marcadores imuno-histoquímicos. Deste modo, pretende-se contribuir para a caracterização do colangiocarcinoma distal como subtipo individual de colangiocarcinoma e para a criação de um racional de aplicabilidade de novas modalidades terapêuticas, dirigidas aos marcadores imuno-histoquímicos em estudo, em contexto adjuvante.

Materiais e Métodos

Desenho do Estudo

O presente estudo foi realizado nos Serviços de Cirurgia A e de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), após aprovação da Comissão de Ética e Conselho Administrativo do CHUC (CHUC-123-20). Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo que incidiu na coorte de doentes com diagnóstico estabelecido de colangiocarcinoma distal e submetidos a duodenopancreatectomia cefálica com intenção curativa, entre janeiro de 2008 e dezembro de 2019, no CHUC, centro de referência Português para o tratamento de colangiocarcinoma.

Seleção da Amostra

Os doentes que integram a amostra foram selecionados a partir da consulta da base de dados do Serviço de Anatomia Patológica do CHUC. Esta base de dados incluiu todos os doentes submetidos a duodenopancreatectomia cefálica no CHUC desde 2008. Na amostra do presente estudo, foram incluídos todos os doentes com um diagnóstico histopatológico confirmado de colangiocarcinoma distal, submetidos a duodenopancreatectomia cefálica entre janeiro de 2008 e dezembro de 2019. Todos os doentes com diagnósticos histopatológicos distintos foram excluídos. Foram excluídos ainda doentes com dados clínicos e / ou patológicos incompletos.

Finda a seleção, foi reunida, então, uma amostra de 37 doentes. Os doentes apresentavam uma idade média de 69,19 anos ($\pm 9,92$), sendo 14 (37,8%) dos doentes do sexo feminino. 13 doentes (36,1%) tinham história pessoal de diabetes (tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização da Amostra

Idade (N=37)	69,19 ($\pm 9,92$) ^a
Sexo (N=37)	
-Feminino	14 (37,8) ^b
-Masculino	23 (62,2) ^b
Diabetes (N=36)	
-Diabéticos	13 (36,1) ^b
-Não Diabéticos	23 (63,9) ^b

^a Média (desvio padrão); ^b Frequência absoluta (percentagem)

Colheita de Dados

Os dados clínicos foram colhidos dos ficheiros clínicos dos doentes, registando-se informações demográficas (idade e sexo), história pessoal de diabetes e apresentação clínica (icterícia, dor abdominal, náuseas e vômitos, perda ponderal, colangite pré-operatória, dilatação biliar e/ou do canal de *Wirsung* e realização de drenagem biliar). Além destes, ainda se colheram dados relativos à avaliação pré-operatória, tais como a classificação de estado físico da *American Society of Anesthesiologists* (ASA) (18), níveis de marcadores tumorais (CA 19-9 e CEA) no momento dos estudos diagnósticos, estudos analíticos pré-operatórios (proteína C reativa (PCR), hemoglobina (Hb), leucócitos, plaquetas, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total e lactato desidrogenase (LDH)). Por fim, colheram-se dados perioperatórios, como a resseção de órgãos adjacentes, culturas biliares (obtidas a partir de bÍlis colhida no decorrer da intervenção cirúrgica), duração do internamento, readmissões após a alta e complicações pós-operatórias.

Intervenção Cirúrgica

Todos os doentes foram submetidos a duodenopancreatectomia cefálica clássica (sem preservação do piloro), com uma reconstrução de *Child* ou em Y de *Roux*, só se tendo procedido a resseção de órgãos adjacentes em três doentes (8,1%). A linfadenectomia foi realizada sistematicamente em todos os doentes, mas sem um número mínimo de gânglios pré-estabelecido. A avaliação extemporânea das margens biliar e pancreática foi realizada sistematicamente em cada intervenção cirúrgica, tendo a resseção sido alargada nos casos em que se verificou envolvimento das margens. Todas as intervenções cirúrgicas foram realizadas por cirurgiões hepatobiliopancreáticos experientes, no CHUC.

Complicações Pós-Operatórias

As complicações pós-operatórias foram classificadas segundo a classificação de *Clavien-Dindo* (19). As hemorragias pós-pancreatectomia e fístulas pancreáticas foram classificadas de acordo com as classificações desenvolvidas para o efeito pelo *International Study Group of Pancreatic Surgery* (ISGPS) (20, 21). Tendo em conta a atualização mais recentemente publicada pela ISGPS, respeitante à classificação das fístulas pancreáticas, na qual as fístulas pancreáticas de grau A foram definidas como fístulas bioquímicas, apenas os graus B e C foram considerados para efeitos de análise no presente estudo (21). As fístulas biliares foram definidas pela presença de drenagem biliar pelo dreno. A deiscência da anastomose gastrojejunal foi definida imagiologicamente e/ou intraoperatoriamente. As infeções abdominais foram definidas pela presença de drenagem purulenta pelo dreno e/ou

por evidência imagiológica, acompanhadas pela elevação de marcadores inflamatórios analíticos (elevação da PCR e leucocitose). A mortalidade perioperatória foi definida como mortalidade nos 30 dias após a intervenção cirúrgica.

Avaliação Anatomopatológica

Os dados relativos à avaliação anatomopatológica foram recolhidos, após consulta dos relatórios histopatológicos pré-existentes com reavaliação das lâminas histopatológicas (se necessário), e incluíram o estado das margens de ressecção, grau de diferenciação histológica, tamanho tumoral, número de gânglios linfáticos estudados, número de gânglios linfáticos envolvidos (com cálculo do rácio gânglios linfáticos envolvidos/estudados), envolvimento microvascular e perineural. Uma margem de ressecção positiva (R+) foi definida pela presença de células tumorais a um ou menos centímetros da margem de ressecção. O grau de diferenciação histológico foi classificado de acordo com o estipulado na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS).

O estadiamento tumoral foi atualizado, nos casos em que tal se verificou necessário, para a 8ª classificação da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

A avaliação imuno-histoquímica foi efetuada com recurso aos seguintes marcadores: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, *human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)*, *cluster of differentiation 44 (CD44)*, *aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)* e *cluster of differentiation 56 (CD56)*.

A avaliação da instabilidade de microssatélites foi efetuada com a marcação para MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Em caso de manutenção da expressão nuclear para todos os marcadores, foi considerado que não existia instabilidade de microssatélites. Em caso de perda de expressão para MLH1/PMS2 (em combinação), MSH2/MSH6 (em combinação), MSH6 ou PMS2 (isolados), seria considerada provável mutação germinativa, e como tal, instabilidade de microssatélites.

A expressão de CD44, ALDH1 e CD56 foi efetuada com intenção de deteção de *cancer stem cells*, tendo-se considerado que para expressão destes marcadores em mais de 50% das células tumorais, existia uma população elevada de *cancer stem cells*.

A expressão de HER2 foi avaliada de forma análoga à do carcinoma gástrico, considerando-se como tendo expressão significativa de HER2 todos os tumores com um *score de Ruschhoff/Hofmann* de +3, com um padrão de reatividade basolateral ou membranar lateral forte e completa em 10% ou mais das células tumorais da peça cirúrgica (15).

As amostras foram observadas num microscópio ótico – Nikon Eclipse 50i e as imagens foram obtidas utilizando uma câmara Nikon-Digital Sight DS-Fi1.

Seguimento dos Doentes e Estabelecimento de Recidiva

Todos os doentes foram integrados num programa de seguimento em consulta, com monitorização dos níveis de marcadores tumorais e avaliação imagiológica com tomografia computadorizada. Este seguimento foi realizado a cada 6 meses durante o primeiro ano após a intervenção cirúrgica e anualmente daí em diante.

A recorrência foi definida imagiologicamente, por tomografia computadorizada (TC). Em situações em que a avaliação imagiológica por TC se revelou duvidosa, recorreu-se a tomografia por emissão de positrões com tomografia computadorizada com 18F-FDG (PET/TC-18F-FDG), ressonância magnética (RM) e/ou avaliação histológica. Após estabelecimento de um diagnóstico de recidiva, as decisões referentes à gestão do doente, no que diz respeito a terapêutica adicional e palição, foram decididas em equipa multidisciplinar para cada caso individual, de acordo com o *state of the art*.

O seguimento dos doentes, para fins do presente estudo, terminou em fevereiro de 2021, ou no momento da morte do doente.

Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada com recurso ao programa IBM SPSS versão 26.0 para o *Windows* (Armonk, NY: IBM Corp.), tendo-se definido significado estatístico para $p < 0,05$.

Os dados qualitativos foram expressos através da sua frequência absoluta e percentagem e os dados quantitativos foram expressos através da média e desvio padrão, ou através da mediana e amplitude interquartil, conforme apropriado, mediante as assimetrias na distribuição dos dados em cada variável.

A análise da sobrevivência global e da sobrevivência livre de doença foi realizada com recurso às curvas de *Kaplan-Meier*, tendo sido os resultados comparados através do teste de *log-rank* em análise univariada.

Procedeu-se, ainda, a análise multivariada com recurso a regressão de Cox para *hazards* proporcionais.

Resultados

Relativamente à apresentação clínica, 32 doentes (94,1%) apresentaram-se com icterícia, 18 (52,9%) com dor abdominal, 12 (37,5%) com náuseas e/ou vômitos e 11 (35,5%) com perda ponderal, como sintomas predominantes. Sete doentes (21,2%) desenvolveram um quadro de colangite pré-operatória. Constatou-se, ecograficamente e/ou com recurso a tomografia computadorizada abdominal, que 35 doentes (100,0%) apresentaram-se com dilatação das vias biliares e cinco (15,6%) com dilatação do ducto de *Wirsung*. Em 18 doentes (60,0%), foi colocada prótese para drenagem das vias biliares, tendo outros quatro doentes (13,3%) sido submetidos a drenagem por colangiopancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE), sem colocação de prótese, e outros dois doentes (6,7%) por colangiografia percutânea transhepática (CPT), também sem colocação de prótese. Em seis doentes (20,0%), não foi realizada drenagem biliar pré-operatória (tabela 2).

No que diz respeito aos marcadores tumorais, os doentes apresentaram um CA 19-9 mediano de 74,50 U/L (16,00-307,75) e um CEA de 2,75 ng/mL (2,10-4,10). Quanto ao estudo analítico realizado em contexto de avaliação pré-operatória, os doentes apresentaram os seguintes valores: PCR de 1,82 mg/dL (0,89-3,69), Hb de 11,85 g/dL ($\pm 1,59$), leucócitos de 7,50 G/L (5,80-12,25), plaquetas de 277,54 G/L ($\pm 82,48$), albuminemia de 3,29 g/dL ($\pm 0,68$), AST de 75,00 U/L (46,00-159,00), ALT de 82,00 U/L (58,00-130,00), FA de 263,50 U/L (170,75-428,75), bilirrubina total de 8,71 mg/dL ($\pm 7,24$) e LDH de 231,00 U/L (176,00-337,75). Ainda em contexto de avaliação pré-operatória, objetivou-se que três doentes (8,3%) apresentaram um score de ASA de I, 21 doentes (58,3%) um score de II, 11 doentes (30,6%) um score de III e um doente (2,8%) um score de IV (tabela 2).

Das culturas biliares, obtidas a partir da bÍlis colhida no decorrer da intervenção cirúrgica, 10 doentes (27,0%) apresentaram uma cultura positiva, 12 doentes (32,4%) apresentaram uma cultura negativa, sem isolamento de qualquer microorganismo, e em 15 doentes (40,5%) não foi realizada cultura biliar. Os doentes apresentaram uma duração média do internamento de 21,96 dias ($\pm 13,79$), tendo sete doentes (22,6%) sido readmitidos após a alta. Relativamente a complicações pós-operatórias, verificaram-se: infeção da ferida operatória em seis doentes (16,7%), infeção intra-abdominal em dois doentes (5,6%), hemorragia pós-operatória de grau B em um doente (2,8%) e de grau C em seis doentes (16,7%), fístula pancreática de grau B em um doente (2,8%) e grau C em cinco doentes (13,9%), fístula biliar em cinco doentes (13,9%), deiscência da anastomose gastrojejunal em um doente (2,8%), tendo-se verificado complicações de outra natureza, tais como infeções nosocomiais, em 13 doentes (36,1%). Quanto à gravidade das referidas complicações, quatro

Tabela 2 – Apresentação Pré-Operatória e Caracterização Pós-Operatória

Apresentação Clínica	
-Icterícia (N=34)	32 (94,1) ^a
-Dor Abdominal (N=34)	18 (52,9) ^a
-Náuseas e/ou Vômitos (N=32)	12 (37,5) ^a
-Perda Ponderal (N=31)	11 (35,5) ^a
-Colangite Pré-Operatória (N=33)	7 (21,2) ^a
-Dilatação Biliar (N=35)	35 (100,0) ^a
-Dilatação Pancreática (N=32)	5 (15,6) ^a
Drenagem Biliar (N=30)	
-CPRE (sem prótese)	4 (13,3) ^a
-CPT (sem prótese)	2 (6,7) ^a
-Colocada Prótese	18 (60,0) ^a
-Não Realizada	6 (20,0) ^a
Estudo Analítico	
-PCR (mg/dL) (N=24)	1,82 (0,89-3,69) ^b
-Hb (g/dL) (N=37)	11,85 (±1,59) ^c
-Leucócitos (G/L) (N= 37)	7,50 (5,80-12,25) ^b
-Plaquetas (G/L) (N=37)	277,54 (±82,48) ^c
-Albumina (g/dL) (N=35)	3,29 (±0,68) ^c
-AST (U/L) (N=35)	75,00 (46,00-159,00) ^b
-ALT (U/L) (N=37)	82,00 (58,00-130,00) ^b
-FA (U/L) (N=36)	263,50 (170,75-428,75) ^b
-Bilirrubina Total (mg/dL) (N=37)	8,71 (±7,24) ^c
-LDH (U/L) (N=34)	231,00 (176,00-337,75) ^b
-CA 19-9 (U/L) (N=30)	74,50 (16,00-307,75) ^b
-CEA (ng/mL) (N=30)	2,75 (2,10-4,10) ^b
Score ASA (N=36)	
-I	3 (8,3) ^a
-II	21 (58,3) ^a
-III	11 (30,6) ^a
-IV	1 (2,8) ^a
Cultura Biliar (N=37)	
-Positiva	10 (27,0) ^a
-Negativa	12 (32,4) ^a
-Não Realizada	15 (40,5) ^a
Duração do Internamento (N=26)	21,96 (±13,79) ^c

^a Frequência absoluta (percentagem); ^b Mediana (amplitude interquartil); ^c Média (desvio padrão)

Tabela 2 – Apresentação Pré-Operatória e Caracterização Pós-Operatória (continuação)

Readmissão Hospitalar (N=36)	
-Com Readmissão	7 (22,6) ^a
-Sem Readmissão	24 (77,4) ^a
Complicações Pós-Operatórias (N=36)	
-Infeção da Ferida Operatória	6 (16,7) ^a
-Infeção Intra-Abdominal	2 (5,6) ^a
-Hemorragia Pós-Operatória	
-Grau A	0 (0,0) ^a
-Grau B	1 (2,8) ^a
-Grau C	6 (16,7) ^a
-Fístula Pancreática	
-Grau B	1 (2,8) ^a
-Grau C	5 (13,9) ^a
-Fístula Biliar	5 (13,9) ^a
-Deiscência da Anastomose Gastrojejunal	1 (2,8) ^a
-Outras Complicações	13 (36,1) ^a
Grau de <i>Clavien-Dindo</i> (N=36)	
-I	4 (11,1) ^a
-II	6 (16,7) ^a
-III	5 (13,9) ^a
-IV	4 (11,1) ^a
-V	6 (16,7) ^a
-Sem Complicações Pós-Operatórias	11 (30,6) ^a
Terapêutica Adjuvante (N=15)	
-Realizada	9 (60,0) ^a
-Não Realizada	6 (40,0) ^a

^a Frequência absoluta (percentagem); ^b Mediana (amplitude interquartil); ^c Média (desvio padrão)

doentes (11,1%) foram classificados como tendo um grau de *Clavien-Dindo* de I, seis doentes (16,7%) com um grau II, cinco doentes (13,9%) com um grau III, quatro doentes (11,1%) com um grau IV e seis doentes (16,7%) com um grau V, o que nos traduz um total de seis doentes (16,7%) que morreram na sequência de complicações pós-operatórias, perfazendo a totalidade da mortalidade perioperatória. Não se verificaram quaisquer complicações em 11 doentes (30,6%) (tabela 2).

Quanto à realização de terapêutica adjuvante, dos 15 doentes para os quais foi possível recolher dados neste domínio, nove doentes (60,0%) foram submetidos a terapêutica

adjuvante e seis doentes (40,0%) não foram submetidos a qualquer modalidade de terapêutica adjuvante (tabela 2).

Avaliação Anatomopatológica e Imuno-histoquímica

Tendo em conta o estadiamento, definido pela AJCC, dois doentes (5,4%) enquadraram-se no grupo I, 24 doentes (64,9%) no grupo II, 11 doentes (29,7%) no grupo III, com nenhum doente a enquadrar-se no grupo IV. Em termos de estadiamento pTNM, um doente (2,7%) foi estadiados com um tumor T1, seis doentes (16,2%) com um tumor T2, 30 doentes (81,1%) com um tumor T3 e nenhum doente com um tumor T4. 21 doentes (56,8%) tinham envolvimento ganglionar (N+) e 16 não revelaram qualquer gânglio estudado envolvido (N0). Foram analisados, em média, 15,49 ($\pm 7,22$) gânglios linfáticos, dos quais uma mediana de 1,00 (0,00-3,50) se verificaram envolvidos, perfazendo-se um rácio de gânglios envolvidos/estudados mediano de 0,08 (0,00-0,25). A avaliação da peça cirúrgica revelou que a resseção cirúrgica foi completa (R0) em 19 doentes (51,4%), apresentando 18 doentes (48,6%) uma resseção com margens positivas. Os tumores apresentaram um tamanho mediano de 2,15 cm (1,50-2,55). Quanto ao grau de diferenciação histológica, nove doentes (29,0%) tinham tumores G1, 21 doentes (67,7%) tumores G2 e um doente (3,2%) um tumor G3. 23 doentes (62,2%) apresentaram invasão microvascular e 30 doentes (81,1 %) invasão perineural (tabela 3).

A avaliação imuno-histoquímica demonstrou expressão de CD44 por oito tumores (34,8%) e de ALDH1 por seis tumores (26,1%), não tendo sido verificada a expressão de HER2 e CD56 por nenhum tumor. Não se verificou, igualmente, défice de expressão das proteínas do sistema de *DNA Mismatch Repair* (dMMR) (tabela 3) (Fig.1 e Fig. 2).

Tabela 3 – Caracterização Anatomopatológica e Imuno-histoquímica

Grupo de Estadiamento (N=37)	
-I	2 (5,4%) ^a
-II	24 (64,9%) ^a
-III	11 (29,7%) ^a
-IV	0 (0,0%) ^a
Estadiamento pT (N=37)	
-pT1	1 (2,7%) ^a
-pT2	6 (16,2%) ^a
-pT3	30 (81,1%) ^a
-pT4	0 (0,0%) ^a
Rácio de Gânglios Envolvidos/Estudados (N=37)	0,08 (0,00-0,25) ^b

^a Frequência absoluta (percentagem); ^b Mediana (amplitude interquartil)

Tabela 3 – Caracterização Anatomopatológica e Imuno-histoquímica (continuação)

Envolvimento Ganglionar (N=37)	
-N0	16 (43,2%) ^a
-N+	21 (56,8%) ^a
Estado das Margens (N=37)	
-R0	19 (51,4%) ^a
-R+	18 (48,6%) ^a
Tamanho Tumoral (cm) (N=32)	
	2,15 (1,50-2,55) ^b
Grau Histológico (N=31)	
-G1	9 (29,0%) ^a
-G2	21 (67,7%) ^a
-G3	1 (3,2%) ^a
Invasão Microvascular (N=37)	
-Com Invasão Microvascular	23 (62,2%) ^a
-Sem Invasão Microvascular	14 (37,8%) ^a
Invasão Perineural (N=37)	
-Com Invasão Perineural	30 (81,1 %) ^a
-Sem Invasão Perineural	7 (18,9%) ^a
Avaliação Imuno-histoquímica (Expressão do Marcador) (N=23)	
-HER2	0 (0,0%) ^a
-Marcadores de Instabilidade de Microssatélites	
-MLH1	23 (100,0%) ^a
-MSH2	23 (100,0%) ^a
-MSH6	23 (100,0%) ^a
-PMS2	23 (100,0%) ^a
-Marcadores de <i>Cancer Stem Cells</i>	
-CD44	8 (34,8%) ^a
-ALDH1	6 (26,1%) ^a
-CD56	0 (0,0%) ^a

^a Frequência absoluta (percentagem); ^b Mediana (amplitude interquartil)

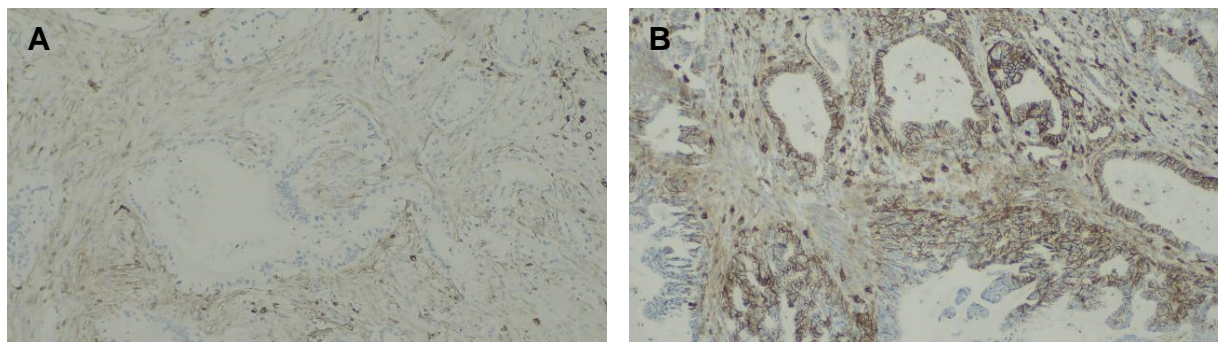


Fig. 1 – Avaliação Imuno-histoquímica (CD44): A – Tumor sem expressão imuno-histoquímica de CD44 (40x); B – Tumor com expressão imuno-histoquímica de CD44 (100x).

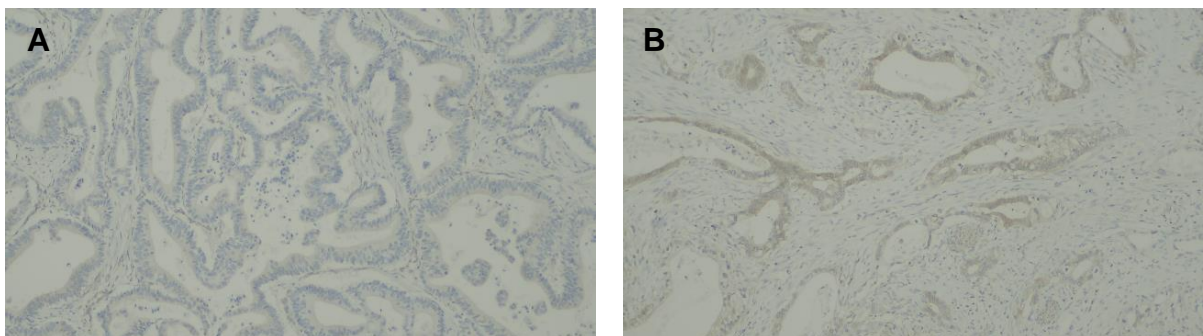


Fig. 2 – Avaliação Imuno-histoquímica (ALDH1): A – Tumor sem expressão imuno-histoquímica de ALDH1 (100x); B – Tumor com expressão imuno-histoquímica de ALDH1 (40x).

Sobrevivência Global e Sobrevivência Livre de Doença

Relativamente à SG, após uma mediana de *follow-up* de $14 \pm 23,7$ meses (0-116), verificou-se que esta apresentou uma mediana de $16 \pm 2,8$ meses (10,6-21,4), com 24,8% dos doentes vivos ao final de 3 anos e 16,5% ao final de 5 anos. No que diz respeito à SLD, esta revelou uma mediana de $14 \pm 5,2$ meses (3,8-24,1) (Fig.3). Verificou-se recidiva tumoral em 15 (40,5%) dos doentes, tendo cinco doentes (13,5%) recidiva local, oito doentes (21,6%) carcinomatose peritoneal, um doente (2,7%) recidiva ganglionar, nove doentes (24,3%) metastização hepática, quatro doentes (10,8%) metastização pulmonar e dois doentes (5,4%) metastização óssea.

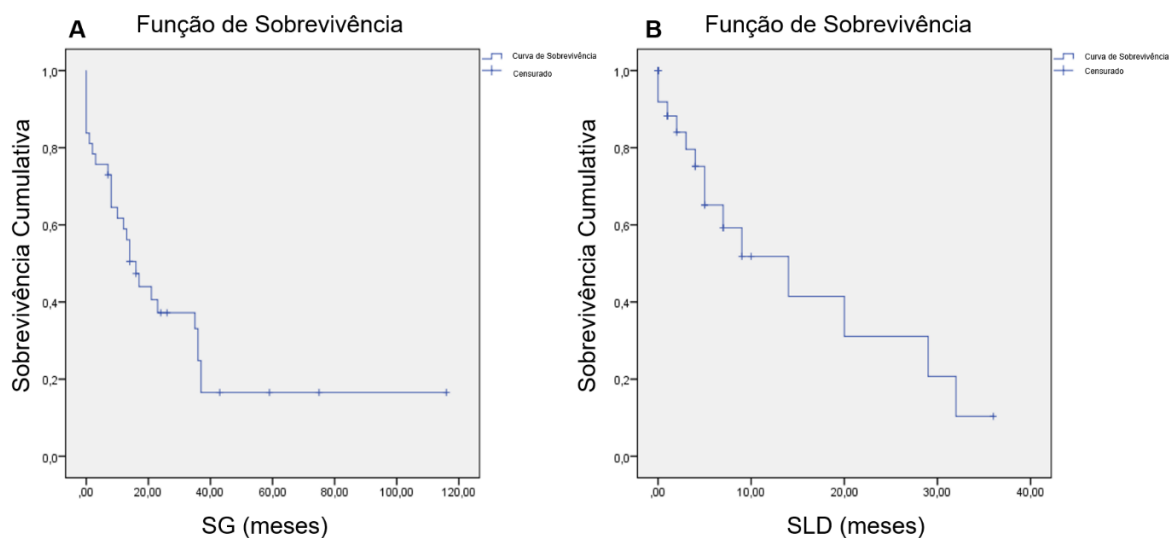


Fig. 3 – Curvas de *Kaplan-Meier* da sobrevivência global (A) e da sobrevivência livre de doença (B) da totalidade da amostra em estudo. SG, sobrevivência global; SLD, sobrevivência livre de doença.

Marcadores com Impacto na Sobrevivência Global e Sobrevivência Livre de Doença

Em análise univariada, verificou-se que os seguintes fatores apresentaram impacto na SG: resseção de órgãos adjacentes (3,67 vs. 34,58 meses, $p=0,010$), grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III (9,75 vs. 47,13 meses, $p=0,003$), hemorragia pós-operatória de grau C

(8,00 vs. 37,29 meses, $p=0,030$), fístula biliar (3,20 vs. 37,61 meses, $p<0,001$), margens de resseção positivas (13,72 vs. 52,10 meses, $p=0,006$), expressão de CD44 (49,44 vs. 15,89 meses, $p=0,032$) e ALDH1 (7,67 vs. 36,39 meses, $p=0,016$) (tabela 4). Relativamente à SLD, verificou-se que a hemorragia pós-operatória de grau C (1,67 vs. 17,25 meses, $p=0,042$), fístula pancreática de grau C (1,60 vs. 17,29 meses, $p=0,022$) e fístula gastrojejunal (2,00 vs. 16,90 meses, $p=0,042$) se associam a uma menor SLD (tabela 4).

Tabela 4 – Análise Univariada

	Frequência Absoluta (%)	Sobrevivência Global (P Value)^a	Sobrevivência Livre de Doença (P Value)^a
Resseção de Órgãos Adjacentes (N=37)			
-Sim	3 (8,1)	<u>0,010</u>	0,100
-Não	34 (91,9)		
Grau de Clavien-Dindo (N=36)			
< Grau III	21 (58,3)	<u>0,003</u>	0,130
≥ Grau III	15 (41,7)		
Complicações Pós-Operatórias (N=36)			
-Hemorragia Pós-Operatória			
< Grau C	30 (83,3)	<u>0,030</u>	<u>0,042</u>
≥ Grau C	6 (16,7)		
-Fístula Pancreática			
< Grau C	31 (96,1)	0,091	<u>0,022</u>
≥ Grau C	5 (13,9)		
-Fístula Biliar			
-Sim	5 (13,9)	<u>≤ 0,001</u>	0,342
-Não	31 (86,1)		
-Deiscência da Anastomose Gastrojejunal			
-Sim	1 (2,8)	0,598	<u>0,042</u>
-Não	35 (97,2)		
Estado das Margens (N=37)			
-R0	19 (51,4%)	<u>0,006</u>	0,447
-R+	18 (48,6%)		
Marcadores de Cancer Stem Cells (N=23)			
-CD44			
-Expressa	8 (34,8)	<u>0,032</u>	0,596
-Não expressa	15 (65,2)		

^a Teste de Log-Rank

Tabela 4 – Análise Univariada (continuação)

-ALDH1			
-Expressa	6 (26,1)	0,016	0,715
-Não expressa	17 (73,9)		

^a Teste de *Log-Rank*

Nenhum outro parâmetro apresentou impacto estatisticamente significativo na SG ou na SLD (Anexo I).

Fatores de Prognóstico Independentes com Influência na Sobrevida Global

A análise multivariada realizada confirmou que a incidência de complicações pós-operatórias com um grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III (HR=6,64, [1,07;41,31], p=0,042), margens de ressecção positivas (HR=5,81, [1,05;32,05] p=0,043), expressão de CD44 (HR=0,089, [0,01;0,82], p=0,033) e ALDH1 (HR=9,24, [1,14;74,76], p=0,037) se estabelecem como fatores de prognóstico independentes com influência na SG. A análise multivariada confirmou também que, enquanto a incidência de complicações pós-operatórias com um grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III, as margens de ressecção positivas e a expressão de ALDH1 pelos tumores tiveram um impacto negativo sobre o prognóstico, associando-se a uma menor SG, a expressão de CD44 pelos tumores teve um impacto positivo sobre o prognóstico, associando-se a uma maior SG (tabela 5).

Tabela 5 – Análise Multivariada

	HR ^a	IC 95% ^b	P Value ^c
Grau de <i>Clavien-Dindo</i> ≥ III	6,64	[1,07;41,31]	0,042
Hemorragia Pós-Operatória Grau C	0,68	[0,06;7,64]	0,752
Fístula Biliar	4,67	[0,61;36,10]	0,139
Margens de Ressecção Positivas	5,81	[1,05;32,05]	0,043
Envolvimento Ganglionar	3,38	[0,61;18,45]	0,159
Invasão Microvascular	7,49	[0,97;57,67]	0,053
Invasão Perineural	0,234	[0,04;1,28]	0,093
Expressão de CD44	0,089	[0,01;0,82]	0,033
Expressão de ALDH1	9,24	[1,14;74,76]	0,037

^a *Hazard Ratio*; ^b Intervalo de Confiança para o *Hazard Ratio* a 95%; ^c Regressão de Cox para *Hazards* Proporcionais

Discussão

O prognóstico dos doentes com colangiocarcinoma distal, mesmo quando submetidos a ressecção cirúrgica curativa, é reservado. Isto torna o estabelecimento de marcadores de prognóstico, que permitam o desenvolvimento de um racional de aplicabilidade de terapêuticas adjuvantes, de extrema importância. De facto, o presente estudo revelou uma SG inferior à reportada pela maioria dos estudos, com uma SG mediana de $16 \pm 2,8$ meses (10,6-21,4) e uma SG mediana aos 5 anos de 16,55%. A meta-análise de Yanming Zhou *et al.*(13), publicada em 2015, reporta uma SG mediana de 33 meses e uma SG mediana aos 5 anos de 37%. Estudos mais recentes, centrados em populações ocidentais (3, 22), como o estudo de Marin Strijker *et al.* (3), publicado em 2019, reportam resultados mais próximos, com uma SG mediana de 21,9 meses. Efetivamente, a idade mediana dos doentes do presente estudo encontra-se mais próxima da reportada por Marin Strijker *et al.*(3) do que a reportada por Yanming Zhou *et al.* (13). Além disto, no presente estudo, verificou-se uma frequência de margens de ressecção positivas, invasão microvascular e perineural superior à constatada por Yanming Zhou *et al.* (13), cujo estudo em causa, inclusivamente, os estabelece como tendo um impacto negativo no prognóstico dos doentes com colangiocarcinoma distal.

Por sua vez, no que toca à SLD, verificou-se uma mediana de $14 \pm 5,2$ meses (3,8-24,1), um panorama muito mais próximo do que se encontra presentemente reportado (23-25). Com efeito, até os padrões de recidiva que se constataram foram idênticos aos atualmente descritos, com o fígado como o local mais comum de metastização à distância, seguindo-se a carcinomatose peritoneal e a metastização pulmonar (23, 24). O único ponto particularmente divergente da literatura no que diz respeito ao padrão de metastização é referente à recidiva ganglionar, que se verificou somente num doente. Esta divergência, no entanto, não se refletirá numa redução real na incidência de recidiva ganglionar, mas sim numa ausência de confirmação do envolvimento de gânglios linfáticos descritos como tendo significado incerto na avaliação dos doentes e que não foram, portanto, estabelecidos como casos de recidiva ganglionar efetiva.

No que diz respeito à mortalidade perioperatória, composta exclusivamente por casos de mortalidade subsequente a complicações pós-operatórias, constata-se que foi consideravelmente superior à reportada na literatura (12, 13, 26). No entanto, assentando o presente estudo numa amostra que não é composta por doentes consecutivos, o valor percentual de mortalidade perioperatória poderá estar sujeito a um viés de seleção importante. De facto, foi excluído do estudo um número considerável de doentes perdidos para *follow-up* imediatamente após a alta do internamento motivado pela intervenção cirúrgica em causa, doentes estes que, não tendo morrido em internamento, terão sobrevivido além dos 30 dias

após a intervenção. Este viés torna-se ainda mais evidente quando atentamos na morbidade pós-operatória verificada, que se enquadrou inteiramente no que se encontra atualmente reportado na literatura (12, 27, 28). Mais ainda, é de referir que a maioria destes casos de mortalidade se verificarem em indivíduos com mais de 70 anos.

Em 8,1% dos doentes integrantes da amostra do presente estudo, foi necessário proceder a resseção de órgãos adjacentes, fator este que, inclusivamente, revelou ter impacto na SG. Este impacto foi também constatado por Laetitia Courtin-Tanguy *et al.* (29). Poderá ficar a dever-se não só ao facto de a resseção de órgãos adjacentes traduzir uma doença de base que é, por defeito, localmente mais avançada, mas também ao facto de a resseção de órgãos adjacentes implicar uma maior agressividade cirúrgica e morbidade. Com efeito, dos três doentes em que se procedeu a resseção de órgãos adjacentes, dois apresentavam um estadiamento T3, dois apresentavam margens de resseção positivas, e todos apresentaram complicações pós-operatórias com grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III.

No que concerne à morbidade pós-operatória, tal como foi já referido, constatou-se um cenário em plena concordância com o que se reporta na literatura (12, 27, 28). Inclusivamente, verificou-se que a incidência de complicações pós-operatórias com grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III, hemorragia pós-operatória de grau C e fístula biliar apresentaram impacto na SG, e que a incidência hemorragia pós-operatória de grau C, fístula pancreática de grau C e de deiscência da anastomose gastrojejunal apresentaram impacto na SLD. Além disto, a ocorrência de complicações com grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III foi estabelecida como fator independente com impacto na SG, em análise multivariada. Com efeito, o impacto da morbidade pós-operatória no prognóstico a longo prazo dos doentes com colangiocarcinoma já foi verificada por outros autores, tais como Stefano Andrianello *et al.* (12). Além de demonstrar uma maior incidência de complicações pós-operatórias nos doentes submetidos a duodenopancreatectomia cefálica por colangiocarcinoma distal, Stefano Andrianello *et al.* (12) constatou que a incidência de fístulas pancreáticas apresentavam um impacto mais significativo na SG dos doentes com colangiocarcinoma distal do que nos doentes com adenocarcinoma pancreático. Stefan Buettner *et al.* (28), por sua vez, demonstrou que as infeções da ferida operatória e loca cirúrgica apresentam impacto negativo sobre a SLD, postulando uma base fisiopatológica para este impacto. Com base em vários estudos que demonstram o papel fundamental do sistema imunitário no colangiocarcinoma, mais concretamente, das populações de linfócitos intratumorais e mediadores inflamatórios (30, 31), Stefan Buettner *et al.* (28) propõe que as infeções da ferida operatória e loca cirúrgica induzem alterações inflamatórias que facilitam o desenvolvimento de doença metastática. Efetivamente, já em 2003, foi compilada por Coffey

et al. (32) um conjunto de evidência que demonstra o impacto que a morbilidade cirúrgica, associada à ressecção de tumores sólidos, tem sobre a progressão de doença residual. Coffey *et al.* (32) realça, em particular, o papel crítico das células *Natural Killer* (NK), cuja atividade anti-tumoral se verifica reduzida no período pós-operatório. Apesar de Coffey *et al.* (32) não incidir no colangiocarcinoma em particular, o papel das células NK no colangiocarcinoma tem já sido alvo de caracterização e estudo. Foi já verificado por Martín-Sierra *et al.* (33) que a infiltração tumoral de células NK, CD8⁺ e CD56⁺ no colangiocarcinoma é inferior à que se verifica no carcinoma hepatocelular, propondo que tal poderá, em parte, explicar o pior prognóstico do colangiocarcinoma em relação ao do carcinoma hepatocelular.

A elegibilidade para instituição de terapêutica adjuvante é também condicionada pela incidência de morbilidade pós-operatória. Mais ainda, para a maioria dos doentes do presente estudo, a decisão de instituição de terapêutica adjuvante foi tomada em reunião de decisão multidisciplinar, ficando os esquemas terapêuticos e os próprios agentes a serem empregues à decisão da equipa, mediante cada caso individual. Isto, porque a evidência científica disponível, até então, não permitia um consenso quanto aos melhores regimes a instituir. Somente em 2019, foi publicada, pela *American Society of Clinical Oncology*, uma *guideline* para a instituição de terapêutica adjuvante nos tumores das vias biliares submetidos a ressecção (6). Com base no ensaio clínico randomizado de fase III BILCAP (7), passou-se a recomendar um esquema de capecitabina aos doentes com tumores das vias biliares submetidos a ressecção curativa. Já para os doentes com tumores das vias biliares com margens de ressecção microscopicamente invadidas, passou-se a recomendar, com base no ensaio prospetivo de braço único SWOG0809 (8), um esquema de quimiorradioterapia. Assim sendo, apesar de no presente estudo não se ter verificado impacto estatisticamente significativo da instituição de terapêutica adjuvante na SG ou SLD, considerando o reduzido número de doentes para os quais foi possível recolher dados face à sua instituição e a grande variabilidade na escolha dos mesmos, este resultado estará, com certeza, sujeito a enviesamento de seleção, não refletindo o seu real impacto, constatado pela mais atual e cada vez mais relevante evidência científica.

A respeito dos marcadores anatomopatológicos, vários estudos foram já conduzidos no sentido de avaliar o seu impacto prognóstico. Inclusivamente, foram já publicadas duas meta-análises neste tema (13, 14). Deste modo, encontram-se já estabelecidos e aceites pela comunidade científica marcadores anatomopatológicos com impacto na SG dos doentes submetidos a ressecção curativa por colangiocarcinoma distal. De entre estes, destacam-se o estado das margens de ressecção, a metastização ganglionar e a invasão perineural e vascular como os marcadores para os quais há maior consenso e evidência do seu impacto prognóstico

(13, 14, 25). O presente estudo, no entanto, apenas confirmou o estado das margens de resseção como tendo impacto na SG, tendo-se estabelecido como marcador de prognóstico independente, em análise multivariada. Isto realça a importância da realização de exame extemporâneo das margens de resseção, para garantir, com maior certeza, uma resseção completa. Nos doentes que integram a amostra do presente estudo, contudo, verificou-se uma elevada incidência de margens positivas, o que poderá dever-se, por exemplo, à maior incidência de doença localmente invasiva. Com efeito, dos 18 doentes que apresentaram margens positivas, 17 apresentavam um estadiamento T3 ou superior. A ausência de impacto que se verificou para os restantes marcadores pode ser explicada, também, por vários motivos. No que diz respeito ao envolvimento ganglionar, realça-se a grande variabilidade no número de gânglios recolhido em cada linfadenectomia e, conseqüentemente, estudado. O rácio de gânglios linfáticos envolvidos/estudados, no entanto, também não apresentou impacto no prognóstico, apesar de alguns estudos o estabelecerem como um marcador de prognóstico mais fidedigno do que a contagem de gânglios linfáticos envolvidos, não tão dependente do número total de gânglios excisados (34). Deste modo, no que concerne à ausência de impacto que se verificou para o envolvimento ganglionar, invasão microvascular e perineural, temos ainda a considerar o tamanho amostral como limitação importante para a correta avaliação do seu verdadeiro impacto.

Além da avaliação do impacto prognóstico de marcadores clínicos e anatomopatológicos, o presente estudo propôs-se a avaliar a expressão e impacto na SG e SLD de marcadores imuno-histoquímicos, recentemente identificados como potenciais alvos de ação terapêutica. Atualmente, a investigação de novas terapêuticas para o colangiocarcinoma está centrada em 3 grandes domínios: terapêuticas dirigidas a alvos moleculares (1, 9), imunoterapia com *immune checkpoint inhibitors* (1, 11) e, mais recentemente, terapêuticas dirigidas às *cancer stem cells* (10). Deste modo, procedeu-se à pesquisa de instabilidade de microssatélites e expressão de HER2 e dos CD44, ALDH1 e CD56, marcadores de *cancer stem cells*.

A pesquisa conduzida, até ao momento, reporta que a prevalência de instabilidade de microssatélites no colangiocarcinoma é reduzida, particularmente nos colangiocarcinomas extra-hepáticos, para os quais a frequência de níveis elevados de instabilidade de microssatélites está na ordem dos 5% (35). No presente estudo, procedeu-se não à pesquisa direta de instabilidade de microssatélites, mas sim à pesquisa de dMMR, marcador indireto de instabilidade de microssatélites. Não se tendo verificado dMMR em nenhum dos tumores avaliados, conclui-se que, tal como reporta a literatura referente aos colangiocarcinomas extra-hepáticos, também no colangiocarcinoma distal a prevalência de instabilidade de

microssatélites será reduzida. No entanto, apesar da reduzida prevalência de instabilidade de microssatélites e dMMR no colangiocarcinoma, a pesquisa sistemática da sua presença é cada vez mais consensual e recomendada (36). Estudos recentes mostram que tumores com níveis elevados de instabilidade de microssatélites apresentam uma suscetibilidade considerável a imunoterapia com *immune checkpoint inhibitors*. Mais recentemente, o ensaio clínico de fase II KEYNOTE-158, que incluiu 22 doentes com colangiocarcinoma, demonstrou o benefício do tratamento com Pembrolizumab, um *anti-programmed death-1 immune checkpoint inhibitor*, em doentes com níveis elevados de instabilidade de microssatélites ou dMMR (16).

Os resultados promissores das terapêuticas dirigidas ao HER2, em outros tumores, levou à pesquisa da sua expressão e impacto prognóstico no colangiocarcinoma (9). A expressão de HER2, no entanto, revela-se rara (37). Com efeito, apesar de alguns estudos mostrarem que a sua expressão, de entre os vários tipos de colangiocarcinoma, é mais frequente nos colangiocarcinomas distais (37), no presente estudo, não se verificou a sua expressão em nenhum dos tumores avaliados. Embora rara, o seu impacto negativo na sobrevivência livre de doença foi recentemente constatado por Caterina Vivaldi *et al.* (38) defendendo o seu uso na estratificação do prognóstico dos doentes com colangiocarcinoma. O estudo da expressão de HER2 e do seu impacto no prognóstico nos doentes com colangiocarcinoma permanece, mesmo assim, limitado, carecendo de cortes de maiores dimensões e maiores níveis de evidência.

De entre os marcadores imuno-histoquímicos estudados, os marcadores referentes às *cancer stem cells* foram os que revelaram resultados mais promissores. Em 2015, Vincenzo Cardinale *et al.* (17) demonstrou que as *cancer stem cells* compõem mais de 30% da massa tumoral dos colangiocarcinomas, contrariamente à proporção mais reduzida verificada na maioria dos tumores sólidos, que está na ordem dos 3%. Estabeleceu, assim, os colangiocarcinomas como “*stem cell-based*” (17). Desde então, verificou-se um crescente interesse no estudo do papel das *cancer stem cells* no colangiocarcinoma, tendo-se já reunido um corpo de evidência considerável (10). Atualmente, é, de facto, consensual o seu papel basilar na oncogénese, comportamento biológico e resistência terapêutica no colangiocarcinoma (1, 2), que em muito se deve à enorme plasticidade tumoral e processos de transição epitélio-mesênquima para os quais as *cancer stem cells* contribuem (1, 10, 39). No presente estudo, a análise imuno-histoquímica revelou, com efeito, sobre-expressão de CD44 e ALDH1 em, respetivamente, 34,8% e 26,1% dos tumores analisados. De facto, estes marcadores revelaram-se fatores de prognóstico independentes com impacto na SG. No que diz respeito ao ALDH1, o presente estudo vem confirmar os resultados reportados por Ze-Yu

Shuang *et al.* (40), que confirmou não só a importância do ALDH1 como marcador funcional de *cancer stem cells* no colangiocarcinoma, como também verificou que este se estabelecia como marcador de prognóstico independente com impacto na SG. Já no que diz respeito ao CD44, os resultados revelaram-se mais contraditórios face ao que se encontra presentemente publicado. Apesar de a maioria dos estudos verificar um impacto negativo do CD44 na SG e SLD (41-43), verificou-se que, na presente amostra, o CD44 apresentou um impacto positivo sobre a SG, com uma *hazard ratio* de 0,089 [0,01;0,82]. Este impacto positivo sobre o prognóstico, no entanto, poderá dever-se ao facto de a maioria dos tumores que verificaram expressão de CD44 serem localmente pouco invasivos, com um estadiamento T2 ou inferior e margens de ressecção livres em mais de metade dos casos. Relativamente ao CD56, não se verificou a sua expressão em qualquer um dos tumores avaliados. Apesar de já ter sido verificado, por Gütgemann *et al.* (44) que o CD56 poderá representar um papel importante na diferenciação entre lesões biliares benignas e malignas, com uma clara associação com as lesões biliares malignas, a evidência de que dispomos atualmente face ao papel do CD56 no colangiocarcinoma é extremamente limitada, impondo-se a necessidade de investigações futuras. Com efeito, os resultados que se reportam no presente estudo, no que diz respeito à expressão de marcadores imuno-histoquímicos de *cancer stem cells*, vêm precisamente vincar a necessidade de estudos futuros, com coortes de maiores dimensões e estratificação da amostra de acordo com os vários subtipos de colangiocarcinoma, a fim de sedimentar o papel dos presentes marcadores na caracterização das populações de *cancer stem cells* de cada subtipo de colangiocarcinoma e estabelecer o seu impacto prognóstico.

Por fim, é importante referir que os resultados e conclusões do presente estudo deverão ser lidos à luz do seu reduzido tamanho da amostra e das limitações inerentes à natureza retrospectiva do estudo, nomeadamente a potencial presença de vieses de seleção.

Conclusão

O colangiocarcinoma distal permanece uma neoplasia com um prognóstico pouco favorável, mesmo após resseção curativa com duodenopancreatectomia cefálica.

O presente estudo demonstrou que a incidência de complicações pós-operatórias com grau de *Clavien-Dindo* igual ou superior a III, a presença de margens de resseção positivas e a expressão de CD44 e ALDH1 se estabelecem como fatores independentes com impacto na sobrevivência global dos doentes com colangiocarcinoma distal. Por este motivo, estes fatores deverão ser tidos em conta na avaliação e estratificação do prognóstico dos doentes, podendo, eventualmente, contribuir para a criação de um racional de aplicabilidade de terapêuticas adjuvantes.

Demonstrou-se, igualmente, a expressão de CD44 e ALDH1 pelo colangiocarcinoma distal, expondo a sua potencial importância na caracterização das populações de *cancer stem cells* no colangiocarcinoma distal.

Agradecimentos

Ao Dr. Ricardo Martins, por ter aceite o desafio de orientar o presente projeto, por todos os conselhos e palavras de incentivo dados ao longo do percurso, pelo interesse que me inculuiu e tudo o que me ensinou.

À Dra. Cristina Camacho, primeira grande impulsionadora deste projeto, pela sua dedicação, por tudo o que me ensinou e que levo comigo para projetos futuros, e pela enorme confiança que sempre teve em mim, mesmo nos momentos em que eu próprio duvidei do que era verdadeiramente capaz.

Ao Dr. Rui Oliveira, que não o sendo formalmente, sempre demonstrou a dedicação e empenho de um orientador. O meu obrigado por todo o seu trabalho na avaliação das lâminas histopatológicas, pela revisão atenta do manuscrito, pela enorme e sempre amável disponibilidade para o esclarecimento de qualquer dúvida, pelo apoio e todos os seus conselhos. Um agradecimento, também, à Dra. Ana Ruivo, pelo auxílio na avaliação das lâminas histopatológicas.

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão e à Dra. Maria Augusta Cipriano, por não só deixarem como incentivarem a realização do presente projeto nos Serviços que, eximamente, dirigem.

Aos 37 doentes que integram a amostra do presente estudo, pois todo o árduo trabalho ao longo do curso e, futuramente, enquanto médico, teve e sempre terá os doentes como o principal motivo de toda a dedicação.

Aos colegas e grandes amigos que o curso me proporcionou e que sempre me apoiaram e incentivaram. Um agradecimento especial à Catarina Silva, à Mafalda Griné, à Sara Melo, à Inês Ramalho e ao Alexandre Oliveira, uma vez que a sua amizade, conversas e desabafos tiveram para mim o maior valor.

À Ana Margarida Cunha, um obrigado há muito devido, por ser das investigadoras que mais admiro, por todos os conselhos valiosos e, principalmente, por toda a compreensão, por todas as angústias partilhadas, todas as palavras de incentivo e confiança. O seu apoio e amizade foram, agora e sempre, fundamentais.

Aos meus amigos que, com os anos, se tornaram uma verdadeira família. Um obrigado especial à Ana Valadão e ao Nuno Salgueiro, que, mesmo longe, estiveram sempre presentes, com todo o carinho, compreensão e amizade.

Aos meus pais, aos meus avós e à minha irmã, que celebraram comigo desde a mais pequena vitória à maior conquista, pelo seu apoio incondicional, infinitos conselhos e carinho,

pois, realmente, caminhamos aos ombros de gigantes, muitas vezes não reconhecidos com o seu devido mérito. São as pessoas em que mais me apoio, que mais me edificam e a quem devo a pessoa que hoje sou. Estar-lhes-ei sempre profundamente agradecido.

Referências Bibliográficas

1. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020.
2. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, Marzioni M, Andersen JB, Invernizzi P, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(5):261-80.
3. Strijker M, Belkouz A, van der Geest LG, van Gulik TM, van Hooft JE, de Meijer VE, et al. Treatment and survival of resected and unresected distal cholangiocarcinoma: a nationwide study. *Acta Oncol*. 2019;58(7):1048-55.
4. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD, Heaton N, Karani J, Pereira SP, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut*. 2012;61(12):1657-69.
5. Miyazaki M, Yoshitomi H, Miyakawa S, Uesaka K, Unno M, Endo I, et al. Clinical practice guidelines for the management of biliary tract cancers 2015: the 2nd English edition. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2015;22(4):249-73.
6. Shroff RT, Kennedy EB, Bachini M, Bekaii-Saab T, Crane C, Edeline J, et al. Adjuvant Therapy for Resected Biliary Tract Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol*. 2019;37(12):1015-27.
7. Primrose JN, Fox RP, Palmer DH, Malik HZ, Prasad R, Mirza D, et al. Capecitabine compared with observation in resected biliary tract cancer (BILCAP): a randomised, controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2019;20(5):663-73.
8. Ben-Josef E, Guthrie KA, El-Khoueiry AB, Corless CL, Zalupski MM, Lowy AM, et al. SWOG S0809: A Phase II Intergroup Trial of Adjuvant Capecitabine and Gemcitabine Followed by Radiotherapy and Concurrent Capecitabine in Extrahepatic Cholangiocarcinoma and Gallbladder Carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(24):2617-22.
9. Iyer P, Chen MH, Goyal L, Denlinger CS. Targets for therapy in biliary tract cancers: the new horizon of personalized medicine. *Chin Clin Oncol*. 2020;9(1):7.

10. Wu HJ, Chu PY. Role of Cancer Stem Cells in Cholangiocarcinoma and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).
11. Jakubowski CD, Azad NS. Immune checkpoint inhibitor therapy in biliary tract cancer (cholangiocarcinoma). *Chin Clin Oncol.* 2020;9(1):2.
12. Andrianello S, Marchegiani G, Malleo G, Rusev BC, Scarpa A, Bonamini D, et al. Over 700 Whipples for Pancreaticobiliary Malignancies: Postoperative Morbidity Is an Additional Negative Prognostic Factor for Distal Bile Duct Cancer. *J Gastrointest Surg.* 2017;21(3):527-33.
13. Zhou Y, Liu S, Wu L, Wan T. Survival after surgical resection of distal cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis of prognostic factors. *Asian J Surg.* 2017;40(2):129-38.
14. Wellner UF, Shen Y, Keck T, Jin W, Xu Z. The survival outcome and prognostic factors for distal cholangiocarcinoma following surgical resection: a meta-analysis for the 5-year survival. *Surg Today.* 2017;47(3):271-9.
15. Bartley AN, Washington MK, Ventura CB, Ismaila N, Colasacco C, Benson AB, 3rd, et al. HER2 Testing and Clinical Decision Making in Gastroesophageal Adenocarcinoma: Guideline From the College of American Pathologists, American Society for Clinical Pathology, and American Society of Clinical Oncology. *Arch Pathol Lab Med.* 2016;140(12):1345-63.
16. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Di Giacomo AM, De Jesus-Acosta A, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(1):1-10.
17. Cardinale V, Renzi A, Carpino G, Torrice A, Bragazzi MC, Giuliante F, et al. Profiles of cancer stem cell subpopulations in cholangiocarcinomas. *Am J Pathol.* 2015;185(6):1724-39.
18. Doyle DJ, Goyal A, Bansal P, Garmon EH. American Society of Anesthesiologists Classification. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

19. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240(2):205-13.
20. Wente MN, Veit JA, Bassi C, Dervenis C, Fingerhut A, Gouma DJ, et al. Postpancreatectomy hemorrhage (PPH): an International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS) definition. *Surgery.* 2007;142(1):20-5.
21. Bassi C, Marchegiani G, Dervenis C, Sarr M, Abu Hilal M, Adham M, et al. The 2016 update of the International Study Group (ISGPS) definition and grading of postoperative pancreatic fistula: 11 Years After. *Surgery.* 2017;161(3):584-91.
22. Waseem D, Tushar P. Intrahepatic, perihilar and distal cholangiocarcinoma: Management and outcomes. *Ann Hepatol.* 2017;16(1):133-9.
23. Nakanishi Y, Okamura K, Tsuchikawa T, Nakamura T, Noji T, Asano T, et al. Time to Recurrence After Surgical Resection and Survival After Recurrence Among Patients with Perihilar and Distal Cholangiocarcinomas. *Ann Surg Oncol.* 2020;27(11):4171-80.
24. Komaya K, Ebata T, Shirai K, Ohira S, Morofuji N, Akutagawa A, et al. Recurrence after resection with curative intent for distal cholangiocarcinoma. *Br J Surg.* 2017;104(4):426-33.
25. Zhou W, Qian L, Rong Y, Zhou Q, Shan J, Li P, et al. Prognostic factors and patterns of recurrence after curative resection for patients with distal cholangiocarcinoma. *Radiother Oncol.* 2020;147:111-7.
26. Arnoletti JP, Fanaian N, Reza J, Sause R, Almodovar AJ, Srivastava M, et al. Pancreatic and bile duct cancer circulating tumor cells (CTC) form immune-resistant multi-cell type clusters in the portal venous circulation. *Cancer Biol Ther.* 2018;19(10):887-97.
27. Roos E, Strijker M, Franken LC, Busch OR, van Hooft JE, Klumpen HJ, et al. Comparison of short- and long-term outcomes between anatomical subtypes of resected biliary tract cancer in a Western high-volume center. *HPB (Oxford).* 2020;22(3):405-14.
28. Buettner S, Ethun CG, Poultsides G, Tran T, Idrees K, Isom CA, et al. Surgical Site Infection Is Associated with Tumor Recurrence in Patients with Extrahepatic Biliary Malignancies. *J Gastrointest Surg.* 2017;21(11):1813-20.

29. Courtin-Tanguy L, Rayar M, Bergeat D, Merdrignac A, Harnoy Y, Boudjema K, et al. The true prognosis of resected distal cholangiocarcinoma. *J Surg Oncol*. 2016;113(5):575-80.
30. Wang Y, Ding M, Zhang Q, Wang J, Yang X, Zhou F, et al. Activation or suppression of the immune response mediators in biliary tract cancer (BTC) patients: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer*. 2017;8(1):74-84.
31. Goepfert B, Frauenschuh L, Zucknick M, Stenzinger A, Andrulis M, Klauschen F, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *Br J Cancer*. 2013;109(10):2665-74.
32. Coffey JC, Wang JH, Smith MJ, Bouchier-Hayes D, Cotter TG, Redmond HP. Excisional surgery for cancer cure: therapy at a cost. *Lancet Oncol*. 2003;4(12):760-8.
33. Martín-Sierra C, Martins R, Laranjeira P, Coucelo M, Abrantes AM, Oliveira RC, et al. Functional and Phenotypic Characterization of Tumor-Infiltrating Leukocyte Subsets and Their Contribution to the Pathogenesis of Hepatocellular Carcinoma and Cholangiocarcinoma. *Transl Oncol*. 2019;12(11):1468-79.
34. You Y, Shin YC, Choi DW, Heo JS, Shin SH, Kim N, et al. Proposed Modification of Staging for Distal Cholangiocarcinoma Based on the Lymph Node Ratio Using Korean Multicenter Database. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).
35. Silva VW, Askan G, Daniel TD, Lowery M, Klimstra DS, Abou-Alfa GK, et al. Biliary carcinomas: pathology and the role of DNA mismatch repair deficiency. *Chin Clin Oncol*. 2016;5(5):62.
36. Goepfert B, Roessler S, Renner M, Singer S, Mehrabi A, Vogel MN, et al. Mismatch repair deficiency is a rare but putative therapeutically relevant finding in non-liver fluke associated cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*. 2019;120(1):109-14.
37. Albrecht T, Rausch M, Rössler S, Albrecht M, Braun JD, Geissler V, et al. HER2 gene (ERBB2) amplification is a rare event in non-liver-fluke associated cholangiocarcinogenesis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1191.
38. Vivaldi C, Fornaro L, Ugolini C, Niccoli C, Musettini G, Pecora I, et al. HER2 Overexpression as a Poor Prognostic Determinant in Resected Biliary Tract Cancer. *Oncologist*. 2020;25(10):886-93.

39. Raggi C, Invernizzi P, Andersen JB. Impact of microenvironment and stem-like plasticity in cholangiocarcinoma: molecular networks and biological concepts. *J Hepatol.* 2015;62(1):198-207.
40. Shuang ZY, Wu WC, Xu J, Lin G, Liu YC, Lao XM, et al. Transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition generates ALDH-positive cells with stem cell properties in cholangiocarcinoma. *Cancer Lett.* 2014;354(2):320-8.
41. Morine Y, Imura S, Ikemoto T, Iwahashi S, Saito YU, Shimada M. CD44 Expression Is a Prognostic Factor in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma After Surgical Resection. *Anticancer Res.* 2017;37(10):5701-5.
42. Padthaisong S, Thanee M, Namwat N, Phetcharaburanin J, Klanrit P, Khuntikeo N, et al. Overexpression of a panel of cancer stem cell markers enhances the predictive capability of the progression and recurrence in the early stage cholangiocarcinoma. *J Transl Med.* 2020;18(1):64.
43. Wattanawongdon W, Simawaranon Bartpho T, Tongtawee T. Expression of CD44 and MDM2 in cholangiocarcinoma is correlated with poor clinicopathologic characteristics. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(10):3961-7.
44. Gütgemann I, Haas S, Berg JP, Zhou H, Büttner R, Fischer HP. CD56 expression aids in the differential diagnosis of cholangiocarcinomas and benign cholangiocellular lesions. *Virchows Arch.* 2006;448(4):407-11.

Anexos

Anexo 1 – Análise Univariada

	Frequência Absoluta (%)	Sobrevivência Global (P Value) ^a	Sobrevivência Livre de Doença (P Value) ^a
Idade (N=37)			
< 65 Anos	12 (32,4)	0,704	0,160
≥ 65 Anos	25 (67,6)		
Sexo (N=37)			
-Feminino	14 (37,8)	0,564	0,267
-Masculino	23 (62,2)		
Diabetes (N=36)			
-Diabéticos	13 (36,1)	0,775	0,370
-Não Diabéticos	23 (63,9)		
Apresentação Clínica			
-Icterícia (N=34)		0,059	0,584
-Sim	32 (94,1)		
-Não	2 (5,9)		
-Dor Abdominal (N=34)		0,605	0,108
-Sim	18 (52,9)		
-Não	16 (47,1)		
-Náuseas e/ou Vômitos (N=32)		0,352	0,705
-Sim	12 (37,5)		
-Não	20 (62,5)		
-Perda Ponderal (N=31)		0,191	0,191
-Sim	11 (35,5)		
-Não	20 (64,5)		
-Colangite Pré-Operatória (N=33)		0,359	0,180
-Sim	7 (21,2)		
-Não	26 (78,8)		
-Dilatação Biliar (N=35)		-	-
-Sim	35 (100,0)		
-Não	0 (0,0)		
-Dilatação Pancreática (N=32)		0,185	0,424
-Sim	5 (15,6)		
-Não	27 (84,4)		
Drenagem Biliar (N=30)			
-Realizada	24 (80,0)	0,457	0,730
-Não Realizada	6 (20,0)		

^a Teste de Log-Rank

Anexo 1 – Análise Univariada (continuação)

Estudo Analítico			
-PCR (mg/dL) (N=24)			
< 0,5 mg/dL	4 (16,7)	0,334	0,443
≥ 0,5 mg/dL	20 (83,3)		
-Hb (g/dL) (N=37)			
< 11,8 g/dL	18 (48,6)	0,901	0,113
≥ 11,8 g/dL	19 (51,4)		
-Leucócitos (G/L) (N= 37)			
< 10,0 G/L	24 (64,9)	0,683	0,092
≥ 10,0 G/L	13 (35,1)		
-Plaquetas (G/L) (N=37)			
< 385 G/L	32 (86,5)	0,901	0,130
≥ 385 G/L	5 (13,5)		
-Albumina (g/dL) (N=35)			
< 3,5 g/dL	22 (62,9)	0,747	0,335
≥ 3,5 g/dL	13 (37,1)		
-AST (U/L) (N=35)			
< 35 U/L	6 (17,1)	0,197	0,818
≥ 35 U/L	29 (82,9)		
-ALT (U/L) (N=37)			
< 45 U/L	6 (16,2)	0,331	0,651
≥ 45 U/L	31 (83,8)		
-FA (U/L) (N=36)			
< 150 U/L	6 (16,7)	0,974	0,912
≥ 150 U/L	30 (83,3)		
-Bilirrubina Total (mg/dL) (N=37)			
< 1,2 mg/dL	7 (18,9)	0,430	0,210
≥ 1,2 mg/dL	30 (81,1)		
-LDH (U/L) (N=34)			
< 220 U/L	15 (44,1)	0,889	0,669
≥ 220 U/L	19 (55,9)		
-CA 19-9 (U/L) (N=30)			
< 37 U/L	13 (43,3)	0,097	0,583
≥ 37 U/L	17 (56,7)		
-CEA (ng/mL) (N=30)			
< 5,4 ng/mL	25 (83,3)	0,745	0,906
≥ 5,4 ng/mL	5 (16,7)		

^a Teste de Log-Rank

Anexo 1 – Análise Univariada (continuação)

Score ASA (N=36)			
< III	24 (66,7)	0,375	0,287
≥ III	12 (33,3)		
Resseção de Órgãos Adjacentes			
-Sim	3 (8,1)	<u>0,010</u>	0,100
-Não	34 (91,9)		
Cultura Biliar (N=37)			
-Positiva	10 (45,5)	0,615	0,496
-Negativa	12 (54,5)		
Duração do Internamento (N=26)			
<15 dias	11 (42,3%)	0,424	0,677
≥ 15 dias	15 (57,7%)		
Readmissão Hospitalar (N=36)			
-Com Readmissão	7 (22,6)	0,422	0,727
-Sem Readmissão	24 (77,4)		
Complicações Pós-Operatórias (N=36)			
-Infeção da Ferida Operatória			
-Sim	6 (16,7)	0,072	0,208
-Não	30 (83,3)		
-Infeção Intra-Abdominal			
-Sim	2 (5,6)	0,342	0,395
-Não	34 (94,4)		
-Hemorragia Pós-Operatória			
< Grau C	30 (83,3)	<u>0,030</u>	<u>0,042</u>
≥ Grau C	6 (16,7)		
-Fístula Pancreática			
< Grau C	31 (96,1)	0,091	<u>0,022</u>
≥ Grau C	5 (13,9)		
-Fístula Biliar			
-Sim	5 (13,9)	<u>< 0,001</u>	0,342
-Não	31 (86,1)		
-Deiscência da Anastomose Gastrojejunal			
-Sim	1 (2,8)	0,598	<u>0,042</u>
-Não	35 (97,2)		

^a Teste de Log-Rank

Anexo 1 – Análise Univariada (continuação)

-Outras Complicações			
-Sim	13 (36,1)	0,814	0,425
-Não	23 (63,9)		
Grau de Clavien-Dindo (N=36)			
< Grau III	21 (58,3)	0,003	0,130
≥ Grau III	15 (41,7)		
Terapêutica Adjuvante (N=15)			
-Realizada	9 (60,0%)	0,062	0,930
-Não Realizada	6 (40,0%)		
Grupo de Estadiamento (N=37)			
< Grau III	26 (70,3)	0,223	0,081
≥ Grau III	11 (29,7)		
Estadiamento T (N=37)			
< T3	7 (18,9)	0,080	0,222
≥ T3	30 (81,1)		
Envolvimento Ganglionar (N=37)			
-N0	16 (43,2%)	0,994	0,838
-N+	21 (56,8%)		
Rácio de Gânglios Envolvidos/Estudados (N=37)			
< 0,2	24 (64,9)	0,548	0,336
≥ 0,2	13 (35,1)		
Estado das Margens (N=37)			
-R0	19 (51,4%)	0,006	0,447
-R+	18 (48,6%)		
Tamanho Tumoral (cm) (N=32)			
< 3 cm	26 (81,3)	0,143	0,587
≥ 3 cm	6 (18,8)		
Grau Histológico (N=31)			
< Grau G2	9 (29,0)	0,334	0,443
≥ Grau G2	22 (71,0)		
Invasão Microvascular (N=37)			
-Com Invasão Microvascular	23 (62,2%)	0,550	0,417
-Sem Invasão Microvascular	14 (37,8%)		
Invasão Perineural (N=37)			
-Com Invasão Perineural	30 (81,1 %)	0,585	0,419
-Sem Invasão Perineural	7 (18,9%)		

^a Teste de Log-Rank

Anexo 1 – Análise Univariada (continuação)

Avaliação Imunohistoquímica			
(N=23)			
-HER2			
-Expressa	23 (100,0)	-	-
-Não expressa	0 (0,0)		
-Marcadores de Instabilidade de Microssatélites			
-MLH1			
-Expressa	23 (100,0)	-	-
-Não expressa	0 (0,0)		
-MSH2			
-Expressa	23 (100,0)	-	-
-Não expressa	0 (0,0)		
-MSH6			
-Expressa	23 (100,0)	-	-
-Não expressa	0 (0,0)		
-PMS2			
-Expressa	23 (100,0)	-	-
-Não expressa	0 (0,0)		
-Marcadores de <i>Cancer Stem Cells</i>			
-CD44			
-Expressa	8 (34,8)	<u>0,032</u>	0,596
-Não expressa	15 (65,2)		
-ALDH1			
-Expressa	6 (26,1)	<u>0,016</u>	0,715
-Não expressa	17 (73,9)		
-CD56			
-Expressa	0 (0,0)	-	-
-Não expressa	23 (100,0)		

^a Teste de *Log-Rank*