

**AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DA INTENSIDADE DE
ACHADOS DE TUMOR BUDDING EM PACIENTES
COM CÂNCER DE CÓLON DE ESTÁDIO II**

AUGUSTO LEITE CANGUÇU

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

L533 Leite Canguçu, Augusto.

Avaliação prognóstica da intensidade de achados de tumor *budding* em pacientes com câncer de cólon de estágio II / Augusto Leite Canguçu - São Paulo, 2020.

36p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Rachel Simões Pimenta Riechelmann

Descritores. 1. Neoplasias Colorretais/Colorectal Neoplasms. 2. Prognósticos/Prognosis. 3. Quimioterapia Adjuvante/Chemotherapy, Adjuvant

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Dedico este trabalho a todos os pacientes que doam suas histórias e assim contribuem ativamente para a construção da ciência. E aos que colocam essas histórias em páginas e artigos o meu muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor, incentivo e parceria em meu crescimento pessoal e profissional. À minha esposa Mirella pelo amor e companheirismo.

À Dra. Rachel Riechelmann, oncologista, pesquisadora do Grupo Brasileiro de Tumores Gastrointestinais, da Sociedade Europeia de Tumores Neuroendócrinos e chefe do Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center, pela amizade, acolhimento e confiança em mim depositada. Se tornou um exemplo pessoal e profissional nos anos de minha formação em Oncologia pelo A.C.Camargo Cancer Center. Muito obrigado pela ajuda constante, Dra. Rachel!

Aos demais coautores deste trabalho: Dr. Celso Abdon Lopes de Melo (oncologista do A.C.Camargo Cancer Center), Dra. Mariana Petaccia (então patologista do A.C.Camargo Cancer Center), Dr. Samuel Aguiar Júnior (cirurgião oncológico e chefe do departamento de cirurgia pélvica do A.C.Camargo Cancer Center), meu agradecimento pelos ensinamentos ao longo desta jornada.

Aos demais coautores da publicação que este projeto resultou: Dra. Tatiane Neotti (patologista do A.C.Camargo Cancer Center), Dr. Ediel Valério e Dr. Roberto Peixoto (patologistas pelo A.C.Camargo Cancer Center), Dr. Vinicius Calsavara (estatístico do A.C.Camargo Cancer Center) pelas valiosas contribuições.

A todos os meus professores, pela contribuição em cada passo de minha jornada. Aos mestres e professores do A.C.Camargo, funcionários do hospital e amigos que fiz em minha caminhada como Oncologista.

Aos meus colegas de residência que se tornaram amigos, eterna turma 64 A.C.Camargo Cancer Center, com os quais tive o imenso prazer de compartilhar momentos importantes de minha vida, meu obrigado e meu carinho, amigos.

Aos familiares e amigos que estavam distantes e que compartilharam comigo a saudade dia a dia.

RESUMO

Leite Canguçu A. **Avaliação prognóstica da intensidade de achados de tumor *budding* em pacientes com câncer de cólon de estágio II.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2020.

INTRODUÇÃO: O Tumor *Budding* (TB) se refere a uma desdiferenciação e perda de coesão tumoral e é definida como a presença de células isoladas ou aglomeradas com até 4 células tumorais na frente do tumor em análise de microscopia. Os estudos prévios com a análise de TB em Câncer Colorretal (CCR) não são padronizados, além de incluírem pacientes de estadiamentos patológicos variados. O International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC), em 2016, propôs um sistema de classificação para padronizar a avaliação patológica do TB no CCR estágio II, como baixo, intermediário e alto TB. **OBJETIVO:** Avaliar a Sobrevida Livre de Recidiva (SLR) em pacientes com CCR estágio II com base na classificação do ITBCC 2016 além da associação entre TB e características clínico-patológicas. **MÉTODOS:** Entre 2007 e 2017, todos os casos de pacientes com CCR estágio II que realizaram cirurgia no A.C.Camargo Cancer Center para ressecção do tumor primário de cólon direito, transversal, cólon descendente, sigmoide e reto foram revisados retrospectivamente através de prontuário médico eletrônico. TB, grau histológico, invasões perineural e vascular-linfática além do número de linfonodos do espécime foram revisados por patologistas. TB foi classificado como baixo (B-TB), intermediário (I-TB) e alto (A-TB) de acordo com a nova classificação do ITBCC2016. Fatores prognósticos foram avaliados pelo modelo de regressão univariado e multivariado de Cox para SLR. **RESULTADOS:** Entre os 137 pacientes incluídos, B-TB foi observado em 107 (78,1%), I-TB em 21 (15,3%) e A-TB em 9 (6,6%). Em um seguimento mediano de 69 meses, a mediana da SLR foi de 134 meses, com 14 pacientes (10,2%) apresentando recidiva do tumor: 10 (9,3%) com B-TB, 2 (9,5%) com I-TB e 2 (22,2%) com A-TB. A invasão perineural foi mais comumente vista no grupo A-TB. Em análise multivariada, TB (A e I vs B; HR 2,6; P = 0,059) e não receber quimioterapia adjuvante (HR 3,7; P = 0,020) foram associados independentemente a SLR. **CONCLUSÕES:** Nesta série de pacientes ocidentais, o grau de TB esteve associado a invasão perineural e ao aumento do risco de recaída da doença.

Descritores: Neoplasias Colorretais. Prognósticos. Quimioterapia Adjuvante

ABSTRACT

Leite Canguçu A. [The prognostic influence of tumor budding in Western patients with stage II colorectal cancer]. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2020.

BACKGROUND: Tumor budding (TB) refers to loss of tumor cohesiveness and is defined as isolated cells or a cell cluster of up to 4 tumor cells at the microscopic analysis. The International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) in 2016 proposed a scoring system to standardize the pathology evaluation of TB in colorectal cancer (CRC) as high (H), intermediate (I) and low (L) TB. **OBJECTIVE:** To evaluate the recurrence-free survival (RFS) of stage II CRC patients (pts) as per the ITBCC 2016 classification and associations between TB and clinic-pathological features. **METHODS:** Cases of stage II CRC undergoing surgery with available tumor tissue underwent central pathology review for TB. Prognostic factors, retrospectively retrieved from electronic medical charts, were evaluated in univariate and multivariate analyses Cox regression analyses for RFS (primary endpoint). **RESULTS:** Among 137 patients included, L-TB was observed in 107 (78.1%), I-TB in 21 (15.3%) and H-TB in 9 (6.6%). In a median follow-up of 69 months, the median RFS was 134 months, with 14 patients (10.2%) presenting tumor recurrence: 10 (9.3%) with L-TB, 2 (9.5%) with I-TB and 2 (22.2%) with H-TB. Perineural invasion were more commonly seen in the H-TB group. In multivariate analysis, TB (H and I vs L; HR 2.6; P = 0.059) and not receiving adjuvant chemotherapy (HR 3.7; P = 0.020) were independently associated with RFS. Adjuvant chemotherapy was associated longer RFS (HR 3.7; P = 0.022). **CONCLUSIONS:** In this series of Western patients, TB grade was associated with perineural invasion and increased risk of disease relapse.

Keywords: Colorectal Neoplasms. Prognosis. Chemotherapy, Adjuvant

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplos de diferentes graus de tumor <i>budding</i> (hotspot = 0.785 mm ²) baseado no ITBCC 2016.....	16
Figura 2	Pacientes avaliados e número de pacientes elegíveis para o estudo após análise de critérios de exclusão.....	19
Figura 3	Sobrevida livre de recorrência: Baixo-TB versus Intermediário-TB versus Alto-TB.....	23
Figura 4	Sobrevida livre de recorrência: Baixo-TB versus Intermediário-TB e Alto-TB	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tumor <i>budding</i> e características clínicopatológicas	21
Tabela 2	Sítios de recorrência de acordo com o agrupamento de TB	22
Tabela 3	Modelo univariado e multivariado de regressão de Cox para Sobrevida Livre de Recorrência	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
ASC	<i>American Cancer Society</i>
ASS	Adenoma serrilhado sésil
AST	Adenoma serrilhado tradicional
A-TB	Alto grau de tumor <i>budding</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ACP	<i>American College of Pathology</i>
AJCC	<i>American Joint Commitee on Cancer</i>
BRAF	Gene humano que codifica a enzima B-Raf.
BSE	Baixo <i>status</i> socioeconômico
B-TB	Baixo grau de tumor <i>budding</i>
CCR	Câncer colorretal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CCRm	Câncer colorretal metastático
ctDNA	DNA tumoral circulante
dMMR	Deficiência das enzimas de reparo do DNA
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EC	Estádio clínico
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confiança
IDH	Índice de desenvolvimento humano
I-TB	Grau intermediário de tumor <i>budding</i>
ITB	<i>Intratumoral tumor budding</i>
ITBCC	<i>International Tumor Budding Consensus Conference</i>
L	Levamisole
LV	Leucovorin
MSI	Instabilidade microsatélite
MSS	Estabilidade microsatélite

NGS	<i>Next Generation Sequence</i>
NSABP	<i>National surgical adjuvant breast and bowel project</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PH	Pólipo hiperplásico
PSS	Pólipo serrilhado séssil
pMMR	Proficiência das enzimas de reparo do DNA
PTB	<i>Peritumoral tumor budding</i>
QUASAR	<i>Quick and simple and reliable trial</i>
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLE	Sobrevida livre de evento
SLP	Sobrevida livre de progressão
SLR	Sobrevida livre de recidiva
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
TB	<i>Tumor budding</i>
Tis	<i>Tumor in situ</i>
TNM	<i>Tumor, node, metastasis</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia do câncer colorretal	1
1.2	Patogênese	3
1.3	Fatores prognósticos em EC II	4
1.4	Evidências do uso de tumor <i>budding</i> como fator prognóstico	7
1.5	Tratamento padrão para CCR de EC II.....	8
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
4	DESFECHOS E METÓDOS	13
4.1	Desfechos.....	13
4.1.1	Primário	13
4.2	Métodos	13
4.2.1	Desenho	13
4.2.2	Casuística	13
4.2.3	Coleta de informações clínicas, patológicas e de sobrevida.....	14
4.2.4	Técnicas utilizadas para Classificação de Tumor <i>Budding</i>	15
4.2.5	Análise Estatística.....	18
4.2.6	Considerações Éticas	18
5	RESULTADOS	19
6	DISCUSSÃO	26
7	CONCLUSÃO	29
8	REFERÊNCIAS.....	30

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é uma das principais causas de câncer no mundo. Particularmente, o câncer de cólon representa cerca de 70% dos casos dentro deste grupo. Para o Brasil, estimam-se 20.520 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 20.470 em mulheres para cada ano no biênio 2020-2022. Esses valores correspondem a um risco estimado de 19,63 casos novos a cada 100 mil homens e 19,03 para cada 100 mil mulheres. Globalmente, o CCR representa o terceiro tipo de câncer mais comum em homens e o segundo em mulheres, entretanto a incidência varia de acordo com características geográficas ¹. As maiores taxas de incidência estão na Austrália/Nova Zelândia, Europa, América do Norte e Leste da Ásia, e as taxas mais baixas são encontradas na África do Sul e Ásia Central ².

As taxas de incidência e de mortalidade por câncer de cólon e reto variam amplamente no mundo segundo o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), sendo identificados três padrões de distribuição da doença: (1) elevação de ambas as taxas nas mais recentes décadas em países que passaram por uma rápida transição econômica, entre eles o Brasil; (2) aumento da incidência e diminuição da mortalidade em países com alto IDH, incluindo Canadá, Reino Unido, Singapura e Dinamarca; e (3) diminuição de ambas as taxas nos países com IDH muito elevado, como Estados Unidos, Japão e França ³.

A idade é o maior fator de risco para o CCR esporádico. O câncer de intestino grosso é incomum antes dos 40 anos; a incidência começa a aumentar significativamente entre as idades de 40 e 50 anos, e as taxas de incidência específicas por idade aumentam a cada década subsequente ^{2,4}.

O baixo status socioeconômico (BSE) também está associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de CCR; Doubeni et al. ⁵ estimaram que o risco de CCR aumentaria em aproximadamente 30% no menor quintil, em comparação com o quintil mais alto de status socioeconômico. Comportamentos potencialmente modificáveis como inatividade física, dieta não saudável, tabagismo e obesidade são considerados responsáveis por uma proporção substancial (estimativas de um terço a metade) da disparidade socioeconômica no risco de CCR de início recente. Outros fatores, particularmente as baixas taxas de acesso ao rastreamento em paciente com BSE, contribuem para as diferenças no risco de CCR ². No cenário

epidemiológico brasileiro, Medeiros et al.⁶, em sua tese de doutorado, relacionou indicadores socioeconômicos com incidência de câncer colorretal na população do município de São Paulo e é possível especular que as características socioeconômicas dos distritos exercem uma influência sobre a ocorrência ou a detecção de casos de câncer colorretal, embora não se possa estabelecer uma relação de causa-efeito.

A suspeita clínica ocorre quando surgem sinais e sintomas (hematoquezia, perda ponderal, alteração em aspecto das fezes), ou pode ser descoberto na rotina através de exames de rastreamento em pacientes de alto risco. Se o exame de sangue oculto nas fezes for positivo, o próximo teste a ser realizado deve ser uma colonoscopia. Geralmente, devido à necessidade de análise histológica, a maioria dos diagnósticos é realizada através da realização de colonoscopia^{5,6,7}.

Patologicamente, a vasta maioria dos cânceres de cólon e reto são adenocarcinomas. O sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) é utilizado para estadiamento e tem valor prognóstico. Na versão recente do sistema – oitava edição AJCC (2018), comparado com a versão de 2010, o estágio M1c foi introduzido para refletir a carcinomatose peritoneal como um fator de prognóstico adverso, e micrometástases nodais (aglomerados tumorais maiores que 0,2 mm em diâmetro) são agora classificadas e quando presentes, conferem pior evolução, dado os resultados de uma metanálise demonstrando um pior prognóstico nestes pacientes⁷.

Esta neoplasia é considerada de bom prognóstico se a doença for diagnosticada em estádios iniciais. De acordo com o banco de dados do *Surveillance Epidemiology, and End Results* (SEER), a sobrevida (doença-específica) estimada em 5 anos pode variar entre taxas acima de 95% para o estágio clínico (EC) I até valores ao redor de 30% para EC III. De acordo com os dados coletados do SEER, a taxa de sobrevida global é de aproximadamente 60% quando avaliamos todos os estádios clínicos agrupados^{3,4}.

Dados mais recentes do banco de dados do SEER e outros registros ocidentais de câncer sugerem que a incidência de CCR está aumentando no grupo abaixo de 50 anos, enquanto está diminuindo em grupos populacionais mais velhos. Por isso, em 2018, a *American Cancer Society* (ACS) emitiu uma recomendação “qualificada” para iniciar a triagem de pessoas com risco geral de CCR aos 45 anos de idade, alterando a orientação prévia de avaliação aos 50 anos, recomendado por diretrizes antigas⁸.

1.2 PATOGÊNESE

- **Sequência Adenoma – Carcinoma**

A maioria dos cânceres colorretais (CCRs) surgem de adenomas, muitos dos quais são pólipos que progridem de pequenos (<8 mm) para grandes (≥ 8 mm) pólipos e, em seguida, para displasia e câncer. Alterações neoplásicas resultam de defeitos genéticos hereditários e adquiridos ^{9,10,11,12,13,14,15}.

A progressão do adenoma para o carcinoma, quando ocorre, ocorre em uma média de pelo menos 10 anos, embora os pólipos sejam normalmente removidos quando encontrados. Pólipos e cânceres são distribuídos aproximadamente uniformemente por todo o cólon e reto, mas tendem a ser mais proximais em mulheres e aumenta a incidência com a idade ¹⁰.

Lesões planas e deprimidas são difíceis de detectar por colonoscopia e são reconhecíveis pela distorção sutil do padrão da mucosa e manchas especiais. Adenomas grandes e planos ≥ 8 mm podem ser mais propensos a conter alterações displásicas ou carcinoma do que os pólipos de tamanho semelhante ¹¹.

A maioria dos pólipos colorretais é adenomatosa ou hiperplásica, que não podem ser distinguidos de forma confiável pela observação direta; a biópsia é necessária para o diagnóstico. Pólipos hiperplásicos geralmente não progridem para lesões neoplásicas ^{9,10,11}.

Dois terços dos pólipos são adenomas. Os adenomas são encontrados em mais de 30% dos homens e 20% das mulheres, e a prevalência aumenta com a idade. Os pólipos hiperplásicos são responsáveis pela maioria dos pólipos remanescentes e são tipicamente pequenos (<1 cm) e distais. Eles geralmente não são pré-malignos, embora haja relatos de cânceres decorrentes de pólipos hiperplásicos isolados. Uma síndrome rara, a polipose hiperplásica, está associada a um grande número de pólipos hiperplásicos e a um risco aumentado de CCR ^{12,13,14,15}.

O intervalo de vigilância com colonoscopia é baseado no tamanho do pólipo e histologia. Em indivíduos com um a dois adenomas serrilhados sesséis (ASS) menores que 10 mm de tamanho sem displasia realizamos colonoscopia de vigilância em 5 a 10 anos. Em indivíduos com três a quatro ASS menores que 10 mm, a colonoscopia de vigilância é repetida em três a cinco anos. Em indivíduos com 5 a 10 ASS menores que 10 mm a colonoscopia de vigilância é realizada em três anos. Indivíduos com ASS maior ou igual a 10 mm, ASS com displasia ou AST são gerenciados como adenomas avançados, com uma primeira colonoscopia de vigilância em três anos ^{16,17,18,19,20}.

O risco para ocorrência de um CCR aumenta com o tamanho do adenoma, número e histologia (por exemplo, os adenomas vilosos tem um risco maior do que os adenomas

tubulares)^{11,12}. O achado de um pólipó adenomatoso sugere uma propensão para formar pólipos, especialmente se for grande (≥ 8 mm), e o paciente deve ser avaliado para outras lesões no cólon e no reto. O número e os tipos de lesões encontrados determinarão o intervalo apropriado para a colonoscopia de vigilância subsequente.

A remoção de pólipos adenomatosos previne o câncer. O *National Polyp Study* acompanhou 1418 pacientes nos quais o exame colonoscópico levou à remoção de um ou mais pólipos. Durante um seguimento mediano de seis anos, a incidência de câncer de cólon foi 88 a 90 por cento menor do que em pacientes relatados em outros estudos que tiveram pólipos que não foram removidos e 76 por cento menor do que na população geral¹³.

Segundo a classificação para tumores colorretais da AJCC, ano 2018,¹⁴ ao invadir a camada lâmina própria, considera-se um tumor *in situ*. Além da submucosa, estágio pT1, e além da muscular própria, pT2. Ao invadir além da muscular própria até o tecido pericólico, considera-se um estágio pT3, correspondendo ao estágio patológico II, na ausência de comprometimento linfonodal. Tumores que invadem o peritônio visceral (pT4a) ou órgãos adjacentes (pT4b) são também classificados como estágio patológico II, na ausência de linfonodos acometidos.

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS EM EC II

Devido a heterogeneidade de características prognósticas em pacientes com câncer de cólon em estadiamento inicial, diversas avaliações histológicas e moleculares estão sendo pesquisadas como fator de estratificação de risco e indicação de quimioterapia adjuvante no cenário de câncer de cólon EC II^{4,7,15}. Como exemplo do grau de heterogeneidade entre o estágio patológico II, vemos diferentes taxas de sobrevida, sendo a SG em 5 anos para o estágio IIC de 58.4% (invasão de órgãos adjacentes) enquanto de 87.5% no estágio IIA (T3-N0)²¹.

O indicador mais importante após ressecção do CCR é o estágio patológico na apresentação. A invasão local para outros órgãos, determinado pelo estadiamento pT4, é fator de pior prognóstico para SG e SLR em estágio II. Associado ao pT4, o número de linfonodos examinados menor que 12 figura como os dois maiores parâmetros prognósticos com alto risco para recorrência da doença no EC II²². Além destes, outras características patológicas importantes a serem avaliadas são: subtipo histológico, grau de diferenciação da neoplasia, presença de invasão angiolinfática e/ou perineural, apresentação clínica com obstrução ou perfuração, além da presença de depósitos tumorais no tecido adiposo. Outros determinantes prognósticos são o nível sérico pré-operatório de antígeno carcinoembrionário (CEA),

instabilidade microssatélite (MSI) e o status mutacional *RAS* e *BRAF*, ainda que estes últimos não interfiram na indicação de adjuvância^{11,15,22}.

Em um estudo retrospectivo com 119.363 pacientes com CCR, aqueles com doença em estágio IIa (pT3pN0) alcançaram SG em 5 anos de 84.7% comparado com 72.2% ($p < 0.001$) daqueles com estágio IIb (pT4pN0)^{23,24}. Em uma coorte prospectiva com 448 pacientes com doença em estágio II tratados com cirurgia, foi encontrada uma menor sobrevida livre de doença específica em pacientes com acometimento pT4a ou pT4b (HR 2.7; IC 95%: 1.1 – 6.2; $p = 0.02$)²⁴. Esses achados colocam o estágio patológico T4 como uma das principais variáveis a serem consideradas na indicação de adjuvância em CCR EC II.

Amostragem linfonodal foi avaliado como fator prognóstico em CCR estágio II. Estudo prospectivo com 35.787 casos com pT3pN0 encontrou o valor de corte mínimo de 13 linfonodos examinados como amostragem para a cirurgia oncológica. A SG em 5 anos variou de acordo com o número de linfonodos examinados. Com mais de 25 linfonodos examinados e negativos, a SG em 5 anos foi de 86%, comparado a 64% na população com um ou dois linfonodos examinados e negativos²⁵. Em outro estudo prospectivo, ressecção de mais de 20 linfonodos negativos aumentou a SG em 5 anos para 87%, comparado a 73% do grupo de pacientes com menos de 10 linfonodos ressecados e negativos ($p < 0.001$)²⁶.

Em análise multivariada com 663 pacientes que realizaram ressecção do CCR, 54.8% dos que possuíam invasão linfática ou vascular desenvolveram metastases a distância comparado com 24.9% dos que não tinham microinvasão ($p < 0.01$)²⁷. Invasão perineural permanece como fator de risco para recorrência, apesar de pouco relatado nos estudos de CCR. Em análise retrospectiva com 255 pacientes com CCR estágio IIa (pT3pN0), invasão perineural foi relacionado a SLD e SG em 5 anos (HR 3.113; $p = 0.046$; HR 9.395; $p = 0.019$; retrospectivamente)²⁸.

Quadros de obstrução ou perfuração colônica podem ocorrer isoladamente ou conjuntamente e ambos conferem pior prognóstico, tanto em mortalidade perioperatória quanto em SG. No estudo INT-0035, pacientes com obstrução colônica tiveram uma taxa de SG em 7 anos de 64% versus 75% naqueles pacientes sem obstrução ($p < 0.05$); nos pacientes com perfuração, a SG em 7 anos foi de 59%, versus 73% naqueles sem perfuração ($p < 0.08$)²⁹. Obstrução colônica foi um fator independente de pior prognóstico para SLR quando analisados os dados de dois estudos randomizados, NSABP C01 e R01 ($p = 0.002$)³⁰. Em contrapartida, no estudo de fase 3 MOSAIC, obstrução foi fator de pior prognóstico para SG em CCR estágio II e III pela análise univariada ($p < 0.001$), mas não na análise multivariada (HR 1.32; IC 95%: 0.97 – 1.70; $p = 0.077$)³¹. Desta forma, mesmo as variáveis obstrução e perfuração não sendo

avaliadas como fatores prognósticos na maioria dos estudos clínicos randomizados que testaram quimioterapia adjuvante no CCR, os principais guidelines consideram como fatores de alto risco para recorrência da doença ²².

A idade é um fator prognóstico para CCR esporádico que permanece controverso. Análise da base de dados do Canadá com 2801 pacientes com CCR, todos acima de 70 anos, indicou que 68% com idade entre 70-79 anos e 24% com idade acima de 80 anos receberam quimioterapia adjuvante. Nesta análise retrospectiva, todos os pacientes se beneficiaram de forma equivalente. Entretanto, a indicação de tratamento adjuvante deve ser associada com o índice de comorbidades de Charlson, garantindo que somente os pacientes que não tenham comorbidades significantes, ou seja, com menor risco de sofrer complicações do tratamento sistêmico quimioterápico, recebam o tratamento adjuvante ²². Ainda nesta discussão, devemos ponderar que na maioria dos estudos randomizados os pacientes acima de 75 anos são pouco representados ou excluídos.

A lateralidade do tumor primário foi avaliada como fator prognóstico em CCR. Uma metanálise, que incluiu 66 estudos com 1.437.846 pacientes, identificou que lateralidade esquerda do tumor primário foi associado a redução do risco de morte independente do estágio da doença (HR 0.82; IC 95%: 0.79 – 0.84; $p < 0.001$) ³². Outros estudos encontraram maior sobrevida para pacientes com CCR de estágio II com tumores primários localizados a direita, independente do grau do tumor e histologia ^{33,34,35}. Devido aos dados controversos na literatura, o impacto da lateralidade no CCR não metastático ainda permanece incerta.

Mutações em um dos vários genes de reparo do DNA são encontradas na síndrome de Lynch (CCR hereditário sem polipose [HNPCC]) e em 15 a 20% dos cânceres de cólon esporádicos. O status de deficiência de DNA MMR (*Mismatch repair*) pode ser identificado por imuno histoquímica, com a perda de expressão das proteínas de MMR (MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2) ou por reação de polimerase em cadeia (PCR) pelo status MSI (instabilidade microssatélite). Na doença localizada, a determinação do status MSI/MMR em pacientes com câncer de cólon localizado tem tanto o objetivo prognóstico e preditivo de benefício a terapia adjuvante como determinar uma potencial predisposição genética ²². A assinatura genética característica dos tumores com deficiência de enzimas de reparo (dMMR) é um alto número de erros de replicação de DNA e altos níveis de DNA-MSI (instabilidade DNA), definidos como instabilidade em ≥ 30 por cento dos locos microssatélites ³⁶.

Entre os pacientes com CCR com estágios iniciais, os tumores com dMMR (MSI-H) estão associados a maior sobrevida em comparação aos que possuem proficiência (pMMR) /

microsatélites estáveis (MSS). A base biológica para esse achado é desconhecida. O MSI é um dos fatores prognósticos clinicamente significativos no estadiamento^{22,37}.

Além do melhor prognóstico proporcionado pela dMMR em um tumor individualmente, a maior parte dos dados disponíveis confirma que a quimioterapia baseada em fluorouracil adjuvante é menos benéfica para pacientes com tumores MSI-H (dMMR). Em pacientes com status de proficiência de MMR (pMMR), não há perda de benefício do uso de quimioterapia a base de fluorouracil, e a mesma deve ser ofertada quando ocorrer a presença de fatores de risco para recorrência. O status dMMR também identifica pacientes que podem se beneficiar de imunoterapia no contexto de doença metastática^{22,36,37}.

1.4 EVIDÊNCIAS DO USO DE TUMOR *BUDDING* COMO FATOR PROGNÓSTICO

Tumor *budding* (do inglês) [TB] ou brotamento tumoral se refere a desdiferenciação e perda da coesividade do tumor e é definido como a presença de células isoladas ou aglomeradas com pelo menos cinco células na frente do tumor na análise microscópica e pode ser estratificado em TB peritumoral (PTB, células tumorais na frente do tumor) ou intratumoral (ITB, células tumorais em brotamento no centro do tumor). O PTB só pode ser avaliado em peças de ressecção endoscópica ou cirúrgica, enquanto o ITB pode ser avaliado em ambos, biópsias e espécimes de ressecção³⁸.

O tumor *budding* já é visto como fator prognóstico em câncer de cólon^{38,39,40,41}. É associado a invasão linfática e está bem estabelecida sua relação com maior risco de metástase linfonodal e pior prognóstico em termos de recorrência e sobrevida global^{15,41,42}. Uma meta-análise que incluiu 12 estudos com 1652 pacientes, o tumor *budding* de alto grau foi associado com pior sobrevida global (SG) em 5 anos (Odds Ratio [OR] 6,25; intervalo de confiança de 95% [IC 95%], 4,04-9,67; $P < 0,00001$). A diferença absoluta em SG em 5 anos foi de menos 25% (95% CI, -18- - 33%, $P < 0,00001$) entre os grupos de alto versus baixo grau de TB. Nestes estudos, não houve uma homogeneidade na avaliação e categorização do TB⁴³.

Em uma coorte com 553 pacientes com CCR, 180 sujeitos com doença em estágio II tiveram suas características demográficas e patológicas analisadas. Tumor *budding* foi estatisticamente associado a estágio patológico mais avançado, estabilidade de microsatélites, mutação no *KRAS* e aumento de mortalidade câncer-específica. Em análise ajustada para outros fatores prognósticos, os pacientes que apresentavam alto grau de TB (10 ou mais *buds*), tiveram

2,5 vezes maior mortalidade câncer-específica do que os pacientes sem alto *budding*, o que coloca a classificação do *budding* como uma questão a ser considerada na avaliação prognóstica. Neste estudo, 10 ou mais *buds* foi associado a um pior prognóstico ⁴⁴.

Em 2016, o *International Tumor Budding Consensus Conference* (ITBCC) padronizou a avaliação do TB em pacientes com CCR estágio II. Neste consenso, especialistas associaram os achados de anatomia patológica aos achados consistentes em literatura até então, padronizando a avaliação do TB. De acordo com o ITBCC, três grupos distintos são formados em relação à quantidade de *buds* identificados à microscopia, definidos desta forma: (1) Grupo TB baixo: com até quatro *buds* no campo de avaliação; (2) Grupo TB intermediário: entre cinco e nove *buds*; (3) Grupo TB alto: com mais de nove *buds* ⁴¹.

Em seu guideline, a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), incluiu o TB como fator prognóstico a ser avaliado dentre os pacientes com CCR estágio II. O *American College of Pathology* (ACP), conforme guideline institucional, recomenda a inclusão do número de *buds* em todo laudo de cancer colorretal estágio II. Nas revisões do TNM de 2017 ^{45,46} ou na AJCC de 2018 esta variável ainda não foi incluída como fator a ser avaliado nestas circunstâncias.

O tumor *budding* pode ser também potencialmente aplicado como um método quantitativo adicional de prognóstico para auxiliar no manejo terapêutico. Por exemplo, pacientes com tumores colorretais pT1 ressecados de forma endoscópica e com *budding* têm aumento do risco de metástases em linfonodos ^{18,36}. Assim sendo, estes pacientes podem se beneficiar de ressecção cirúrgica completa. Já em pacientes com tumores de estágio II, a presença de tumor *budding* de alto grau é um indicador de menor sobrevida livre de doença e global em comparação a *budding* de baixo grau ou sua ausência. Portanto, neste caso, terapia adjuvante poderia ser discutida. Em terceiro lugar, tumor *budding* intratumoral avaliado em biópsias pré-operatórias pode ajudar a selecionar pacientes que se qualificam para terapia neoadjuvante ^{37,38}.

1.5 TRATAMENTO PADRÃO PARA CCR DE EC II

Ressecção cirúrgica é a modalidade de tratamento primário para CCR em estágio inicial (estádio I a III) e a ferramenta mais poderosa para avaliar o prognóstico após cirurgia potencialmente curativa é a análise patológica do espécime ressecado ^{14,15,38,43}.

Quimioterapia paliativa baseada em 5-FU e leucovorin (LV), continuada até o surgimento de toxicidade limitante ou progressão de doença, foi o tratamento base do CCR

metastático (CCRm) por mais de 4 décadas, oferecendo SG inferiores a 12 meses ⁴⁷. O quimioterápico 5-FU é um análogo da base nitrogenada pirimidínica uracila, sendo um quimioterápico da classe das fluoropirimidinas. Difere desta base pela adição de fluoreto na posição do carbono 5, agindo como uma base pirimidínica falsa, interferindo com a síntese do DNA ^{47,48}.

Embora os parâmetros que determinem o estágio patológico sejam os preditores mais fortes do resultado pós-operatório, outras características clínicas, moleculares e histológicas podem influenciar o prognóstico independente do estágio. Entre os pacientes com doença no estágio IV, o prognóstico está mais intimamente ligado à localização, extensão da doença metastática e presença de marcadores moleculares, como por exemplo, a mutação *BRAF* V600E.

Em câncer colorretal, o desfecho sobrevida livre de doença foi comparado a sobrevida global em 5 anos, principal desfecho primário nos estudos clínicos realizados até a década de 90. Na metanálise ACCENT, os desfechos de 18 estudos totalizando 20.898 pacientes com câncer de cólon estágio II e III que realizaram tratamento adjuvante foram avaliados. A associação entre SLD em 3 anos com SG em 5 anos foi maior em pacientes com estágio III; a correlação de HR nos estudos foi de 0.92 (IC 95%, 0.85 a 0.95) para estágio III e 0.70 (IC 95%, 0.44 a 0.80) para estágio II. Desta forma, a SLD em 3 anos se mostrou um desfecho substituto confiável, com alta correlação com SG em 5 anos, quando analisados os estudos com a maioria dos pacientes de estágio III. A partir desta metanálise, SLD em 3 anos se tornou desfecho substituto de SG em 5 anos, sendo adotado nos demais estudos com esta população de pacientes ⁴⁹.

Desde o início dos anos 90, a terapia adjuvante com (5-FU) e levamisole (L), e mais tarde com leucovorin (LV), tem sido o padrão ouro de tratamento para pacientes com câncer de cólon estágio III e alguns casos selecionados de estágio II (considerados como de alto risco de recidiva – pT4, perfurativo ou obstrutivo ou com invasão linfática) ⁴⁷. A oxaliplatina, derivado da platina, foi avaliada em estudo de fase 3 incluindo pacientes com estágio II e III da doença, sendo adicionada ao tratamento adjuvante em pacientes com estágio III, após benefício em sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) ⁴⁸.

O estudo QUASAR ⁵⁰, estudo de fase 3 que avaliou benefício em sobrevida da terapia adjuvante baseada em 5-FU para estágios II e III em câncer de cólon com 3239 pacientes, demonstrou que, para aqueles com doença em estágio II, 5-FU associado a LV obteve 29% de redução de risco de recorrência (HR 0.71; IC 95%: 0.54 – 0.92; p=0.01) com tendência a melhor SG (HR: 0.83; IC 95% 0.65 – 1.07). Neste estudo, 91% dos pacientes eram EC II, com a

ponderação de que a média de linfonodos examinados desta população foi 6. Com base neste estudo, tratamento baseado em fluoropirimidina adjuvante por 6 meses pode ser considerado em pacientes com câncer de cólon EC II de alto risco.

A metanálise IMPACT B2 não mostrou benefício de quimioterapia adjuvante em CCR EC II. Um total de 1016 pacientes de 5 estudos randomizados foram avaliados. A taxa de SG em 5 anos foi 82% no grupo quimioterapia adjuvante versus 80% no grupo controle (HR 0.86, 90% IC 0.68-1.07, $p=0.057$) e a sobrevida livre de evento (SLE) em 5 anos foi 76% no grupo quimioterapia adjuvante e 73% e no grupo seguimento (HR 0.83, IC 90% 0.72 - 1.07). Entretanto, essas diferenças não foram significativas ⁵¹.

A avaliação imuno histoquímica para proteínas dos genes do reparo (MMR) trouxe a busca por um perfil molecular que caracterize pacientes com CCR EC II com maior risco de recidiva. Análise de estudos prévios, em pacientes com estágio II da doença, evidenciou que aqueles com dMMR (MSI-H) não derivam benefício com o tratamento adjuvante baseado em fluoropirimidina ^{52,53,54,55,56}.

Os estudos NSABP C01 e C02 compararam quimioterapia adjuvante versus cirurgia isolada em 1409 pacientes com CCR, sendo 705 com EC II, sendo que estes estudos trazem resultados contrapostos. Enquanto que o NSABP C01 não apresentou benefício em SG com a quimioterapia adjuvante (Taxa de SG em 5 anos 75% versus 72%, nos grupos quimioterapia adjuvante e cirurgia isolada, respectivamente, $p = 0.73$), o NSABP 02 apresentou superioridade da quimioterapia em infusão venosa portal perioperatória comparado a cirurgia isolada em CCR EC II (SG em 5 anos de 88% no grupo quimioterapia versus 76% no grupo cirurgia isolada, $p=0.005$) ⁵⁴.

O estudo MOSAIC foi desenhado para avaliar o benefício em SLD com a adição de oxaliplatina a terapia adjuvante padrão até então, 5-FU e LV, em pacientes com EC II e III. Em uma análise exploratória de pacientes com EC II de alto risco, foi identificado uma tendência para benefício em SLD em 5 anos com terapia a base de oxaliplatina (FOLFOX4) em comparação com 5FU+LV, mas sem ganho de sobrevida global em sua atualização de 10 anos (HR para SLD 0.79, IC 95%: 0.55-1.13; HR para SG 0.89, IC 95%: 0.60-1.32). Neste estudo, pacientes com EC II de alto risco foram aqueles que apresentaram as seguintes características: pT4, perfuração intestinal, obstrução intestinal, tumor pouco diferenciado, invasão venosa ou menos de 10 linfonodos examinados. ³¹

Desta forma, a luz do conhecimento gerado até então, a realização de quimioterapia adjuvante em EC II é discutível. A heterogeneidade deste grupo de pacientes deve ser considerada e avaliar os fatores de alto risco para recorrência se mostra fundamental.

2 JUSTIFICATIVA

Dessa forma, em vista (1) dos avanços no conhecimento sobre o componente de tumor *budding* e sua correlação com prognóstico em paciente com câncer colorretal em estágio inicial, (2) a heterogeneidade dos estudos que utilizaram diferentes pontos de corte para determinar a presença de tumor *budding*, (3) ausência de estudos que avaliaram o prognóstico de tumor *budding* frente outros fatores prognósticos recentemente discutidos, como lateralidade e MSI, (4) avaliação da influência preditiva a terapia sistêmica, propomos um estudo para avaliar as características e os desfechos clínicos em pacientes com câncer colorretal estágio II de acordo com a classificação quantitativa de tumor *budding* de acordo com o ITBCC 2016.

3 OBJETIVOS

- 1 Analisar o grau de TB, de acordo com o ITBCC 2016, agregando os graus intermediário e alto de TB *versus* o baixo, relacionando ao prognóstico em pacientes com câncer colorretal estágio II numa coorte ocidental em termos de Sobrevida Livre de Recidiva (SLR).

- 2 Avaliar a relação entre TB e características clínicas e patológicas.

4 DESFECHOS E MÉTODOS

4.1 DESFECHOS

4.1.1 Primário

Sobrevida Livre de Recidiva: conceituado como tempo entre o procedimento cirúrgico até a recidiva da doença (recidiva confirmada por exame radiológico ou biópsia) ou morte, o que ocorrer primeiro. Elevação isolada de CEA (Antígeno Carcinoembrionário) e/ou novo tumor primário não foram considerados recidiva.

4.2 MÉTODOS

O protocolo utilizado neste estudo está em conformidade com a diretriz ética de 1975 da Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP, protocolo 2633/18 (Anexo 1).

4.2.1 Desenho

Estudo primário, analítico, longitudinal, unicêntrico e retrospectivo, com coleta de dados a partir de prontuário médico eletrônico e revisão dos materiais anatomopatológicos arquivados no Departamento de Anatomia Patológica. A revisão anatomopatológica foi realizada por dois patologistas.

4.2.2 Casuística

Casos de pacientes potencialmente elegíveis foram selecionados do registro hospitalar e da lista administrativa de casos operados no A.C.Camargo Cancer Center no período de 2007 a 2018.

Critérios de elegibilidade:

Critérios de inclusão:

- Diagnóstico de adenocarcinoma confirmado histologicamente;
- Idade maior ou igual a 18 anos;
- Sítios primários colon direito, transverso, esquerdo, sigmoide e reto;

- Estadiamento patológico II (AJCC versão 6 e 7);
- Operados no serviço de Cirurgia Oncológica do A.C.Camargo Cancer Center;
- Material de biópsia preservado no arquivo da Anatomia Patológica para completa revisão pelos Patologistas.

Critérios de exclusão:

- Os pacientes que só realizaram procedimento cirúrgico mas não fizeram seguimento clínico no A.C.Camargo Cancer Center após a cirurgia;
- Material de anatomopatológico insuficiente para análise.

4.2.3 Coleta de informações clínicas, patológicas e de sobrevida

Foram coletadas, de forma retrospectiva, informações provenientes de dados clínicos, contidos em prontuário médico do paciente a respeito das características clínicas, histopatológicas e desfecho clínico.

As características clínicas e histopatológicas incluídas para a análise foram:

- sexo (masculino e feminino);
- história de etilismo ou tabagismo;
- comorbidades ao diagnóstico (graduadas de acordo com o Índice de comorbidade de Charlson ajustado pela idade);
- medicações utilizadas ao diagnóstico;
- idade no dia da cirurgia;
- *performance status* segundo a classificação de *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG);
- história familiar;
- presença de síndrome hereditária familiar conhecida;
- índice de massa corpórea pré-cirúrgico;
- lateralidade do tumor (sendo cólon direito definido do íleo distal até a flexura esplênica; cólon esquerdo, da flexura esplênica até o reto; reto)
- presença de abdome agudo obstrutivo/perfurativo;
- grau de diferenciação da célula tumoral (bem a moderadamente diferenciado e pouco diferenciado);
- profundidade de comprometimento tumoral (pT2, pT3 e pT4);
- envolvimento linfonodal (quantidade de linfonodos ressecados na cirurgia);

- invasão linfática ou vascular ou perineural (presentes ou ausentes);
- CEA pré-cirúrgico e pós-cirúrgico;
- avaliação de instabilidade microssatélite (através da expressão imuno histoquímica de proteínas de reparo do DNA – proficiente ou deficiente);
- status de mutação em *BRAF* V600E (mutado ou selvagem), através do resultado da imunohistoquímica, quando disponível;
- status de mutação em *RAS* (mutado ou selvagem, através do resultado de sequenciamento por *NGS* [*Next Generation Sequence*], quando disponível);
- classificação de tumor *budding* (se positivo – classificados como baixo grau [B-TB]; grau intermediário [I-TB]; ou alto grau [A-TB]);
- realização de quimioterapia (se positivo, qual esquema utilizado; se negativo, motivo da não realização do mesmo);
- recorrência da doença;
- locais de recorrência da doença;
- data da recorrência;
- data da morte;
- data da última avaliação e status do mesmo.

Os tumores foram estadiados de acordo com tamanho, comprometimento linfonodal e presença de metástase segundo os critérios definidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC 6^a e 7^a edições). Ressaltamos que a revisão anatomopatológica de invasões perineural, linfática e vascular, número de linfonodos ressecados, grau histológico e tumor *budding* foi realizada por 2 patologistas experientes. Na ocorrência de dúvidas, eles discutiam os achados para se chegar num consenso.

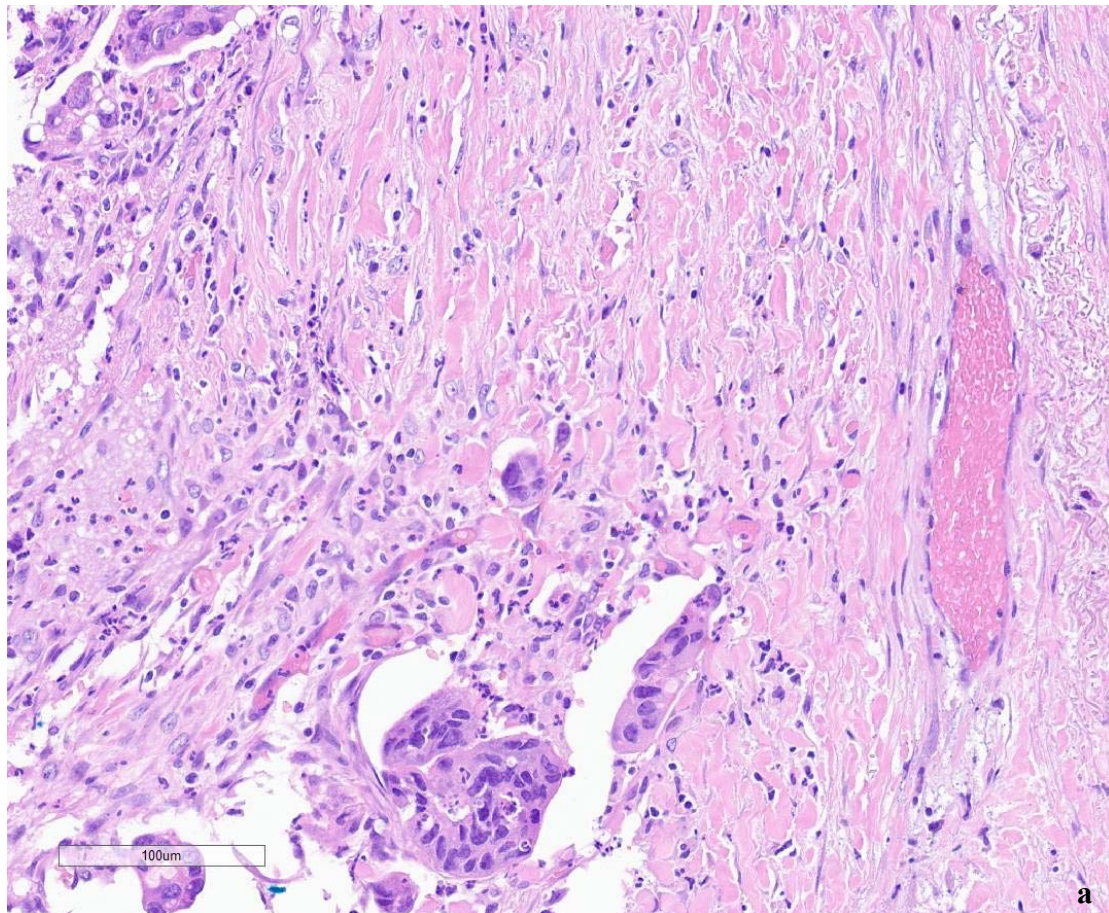
4.2.4 Técnicas utilizadas para classificação de Tumor *Budding*

Selecionamos uma biópsia por paciente e, para cada caso, foram revisadas as lâminas de H&E (hematoxilina-eosina) para selecionar o bloco de parafina mais representativo para análise do *budding* tumoral. O microscópio utilizado nas análises do *budding* foi o Olympus BX51.

Foram selecionados blocos cujos tecidos não apresentavam artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequados.

A presença de células únicas ou pequenos aglomerados de até cinco células na *front* do tumor é considerada como brotamento tumoral peritumoral (PTB). Seguindo a recomendação do ITBCC 2016 utilizamos os seguintes critérios para avaliar o tumor *budding*:

- a contagem de *buds* e a pontuação foram realizadas nas seções de H&E;
- o tumor *budding* foi relatado selecionando-se um “*hotspot*” após a revisão de todas as lâminas disponíveis. O número total de *buds* foi avaliado em uma área de 0,785 mm², a qual corresponde ao campo de 20x em alguns microscópios;
- o número total de *buds* e um escore de três níveis (com base na área de campo de 0,785 mm²) foram relatados: baixo (0-4 *buds*), intermediário (5-9 *buds*) e alto (10 ou mais *buds*).



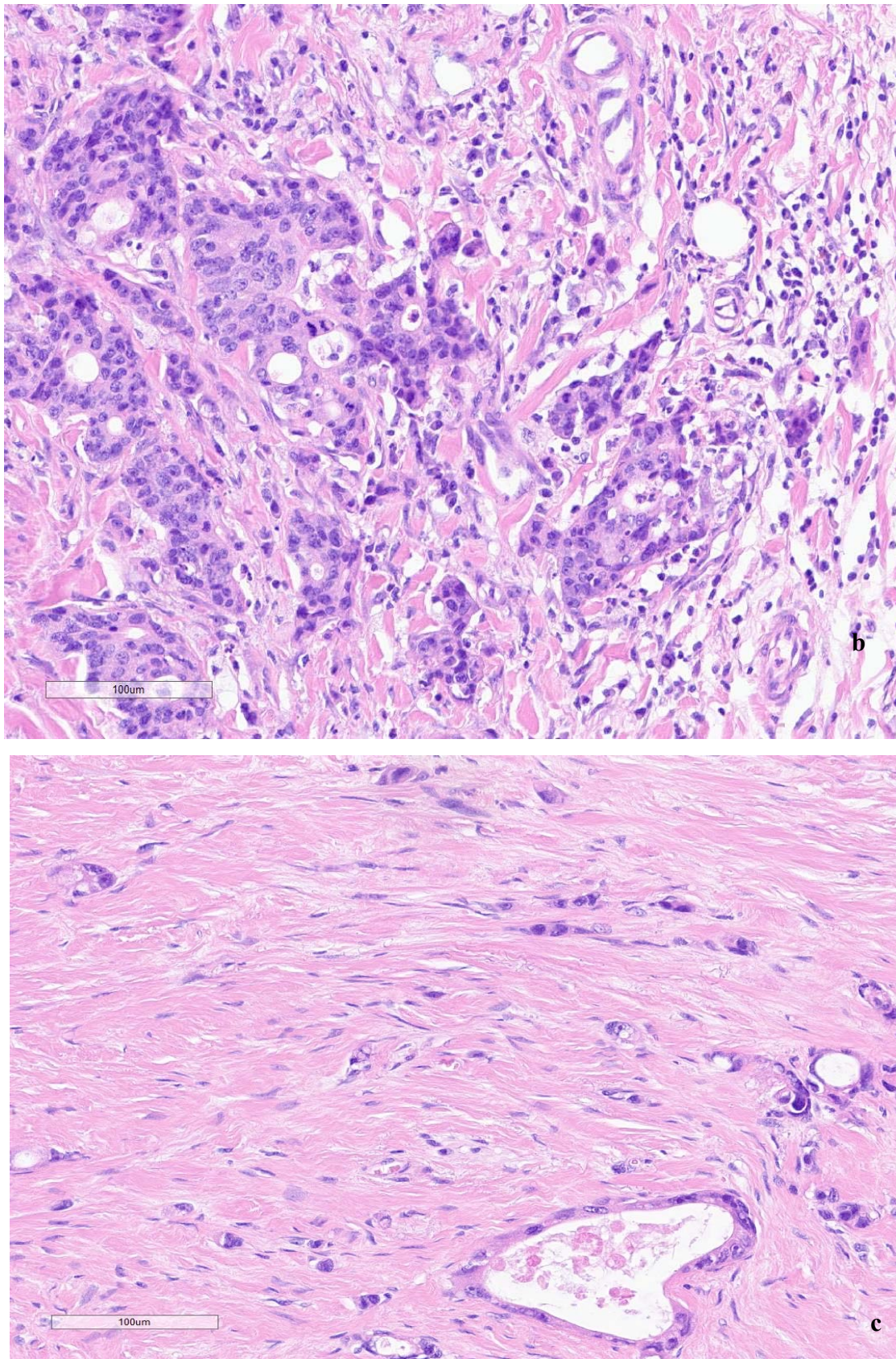


Figura 1 - Exemplos de diferentes graus de tumor *budding* (hotspot = 0.785 mm²) baseado no ITBCC 2016: a) Tumor *budding* baixo grau; b) Tumor *budding* grau intermediário; c) Tumor *budding* alto grau.

4.2.5 Análise Estatística

Os dados foram coletados em planilha de ®Excel e inseridos na plataforma institucional REDCap, sendo analisados no programa SPSS IBM v24.0.

A análise descritiva das variáveis contínuas será apresentada em média, mediana, além das frequências absoluta e percentual.

A associação das variáveis qualitativas categóricas será analisada através do teste qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. Análises de associação serão realizadas entre o grau de tumor *budding*: alto versus intermediário versus baixo grau.

Definiu-se sobrevida livre de recidiva como o intervalo entre a data da cirurgia até recorrência da doença ou morte, o que ocorresse primeiro. A recorrência foi confirmada por biopsia ou exame radiológico. Elevação sérica de antígeno carcinoembrionário e/ou novo tumor primário não foram considerados recidiva.

Os dados de sobrevida foram avaliados através do método não paramétrico de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida livre de doença dos pacientes com tumor *budding* alto, intermediário e baixo foi realizada pelo teste não paramétrico de log-rank. A perda de seguimento ou a ausência da informação foi considerado como dado censurado.

A associação entre presença de alto TB sobre a sobrevida livre de doença foi avaliada utilizando modelo de riscos proporcionais de Cox, obtendo-se valor de *Hazard Ratio* (HR), permitindo identificar valor prognóstico de cada variável sobre o desfecho.

O modelo univariado utilizou as variáveis: Tumor Budding, Índice de comorbidades de Charlson, Lateralidade, Idade, Status T, Invasão Vascular-Linfática, Invasão Perineural, Diferenciação Tumoral, Instabilidade Microssatélite, Realização de Terapia Adjuvante. As variáveis que apresentarem valor p inferior a 0,10 no modelo univariado, foram incluídas na avaliação múltipla.

O menor valor de alfa (nível de significância) escolhido para rejeitar a hipótese nula na comparação entre grupos e na análise multivariada foi 0,05.

4.2.6 Considerações Éticas

O estudo foi realizado de acordo com o protocolo, as diretrizes de Boas Práticas Clínicas da Conferência Internacional de Harmonização (ICH GCP) e as leis e requisitos regulatórios locais aplicáveis. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética Local (protocolo 2633/18). Havia o risco de perda de confidencialidade, caso os dados de pacientes fossem identificados, porém foram tomadas medidas para evitar que isto ocorresse.

5 RESULTADOS

Os dados clínico-demográficos de 189 pacientes foram analisados. Destes, 137 foram elegíveis para o estudo. Os motivos de exclusão foram: 1) 38 pacientes excluídos devido material insuficiente para revisão anatomopatológica; 2) 14 pacientes excluídos devido ausência de seguimento no A.C.Camargo Cancer Center por mais de 2 anos após o procedimento cirúrgico (Figura 2).

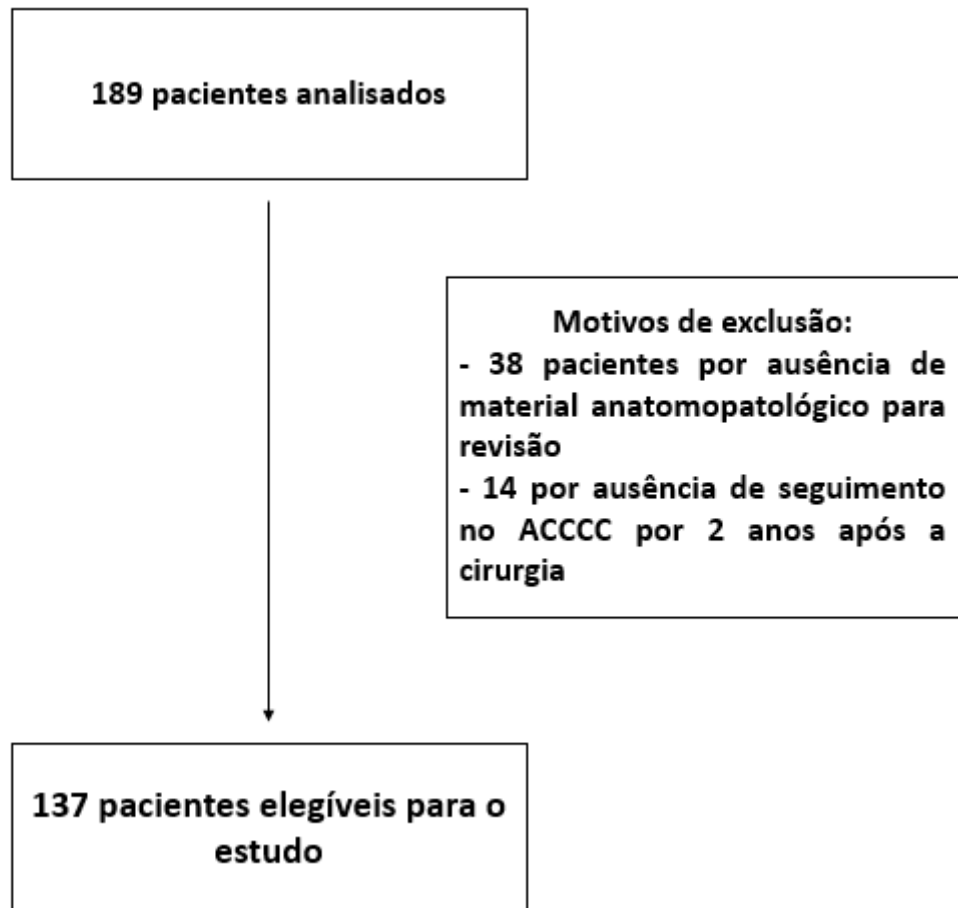


Figura 2 - Pacientes avaliados e número de pacientes elegíveis para o estudo após análise de critérios de exclusão.

A mediana de seguimento da população geral foi de 69 meses (IC 95% 64-73) e a mediana de sobrevida livre de recidiva de 134 meses (IC 95% 103-164). Do total de 137 pacientes, cento e sete (78,1% da amostra) tiveram suas peças cirúrgicas classificadas como baixo grau de tumor *budding* (B-TB); Vinte e um (15,3%) como intermediário (I-TB) e nove (6,6%) com alto grau (A-TB). Setenta e sete indivíduos (56,2%) eram do sexo masculino, o mais prevalente em todos os grupos. A idade mediana da população geral ao diagnóstico foi 61 anos (Tabela 1).

Em todos os três grupos, houve prevalência de lateralidade esquerda com 71 casos totais. A proporção da doença T4 foi de 17,5% dos casos. Invasão perineural foi positiva em seis (5,6%), quatro (19,0%) e cinco (55,6%) pacientes nos grupos B-TB, I-TB e A-TB, respectivamente, e foi relacionada ao aumento do grau de TB ($p < 0,001$; Tabela 1).

A análise da instabilidade microssatélite das proteínas de reparo de DNA por imuno histoquímica foi realizada em 82 pacientes (59,8% da amostra) sendo doze pacientes com perfil deficiente (Tabela 1). Terapia sistêmica adjuvante foi realizada em 50 (36,5%) pacientes; e esta variável se relacionou com o grau de TB ($P=0.042$; Tabela 1).

Tabela 1 - Tumor *budding* e características clínico-patológicas.

Parâmetros	Grau de Tumor Budding			P
	Baixo TB n = 107 (78.1%)	Intermediário TB n = 21 (15.3%)	Alto TB n = 9 (6.6%)	
Sexo				
Masculino	60 (56.1)	11 (52.4)	6 (66.7)	0.769
Feminino	47 (43.9)	10 (47.6)	3 (33.3)	
Idade (min-máx)	61 (25-91)	61 (39-93)	57 (37-72)	0.192
Índice				
Comorbidade				
Chalrson				
≥ 6.0	21 (19.6)	6 (29.6)	0 (0.0)	0.227
< 6.0	86 (80.4)	15 (71.4)	9 (100.0)	
Localização do Tumor				
Cólon direito	31 (29.0)	5 (23.8)	2 (22.2)	0.924
Cólon esquerdo	54 (50.5)	11 (52.4)	6 (66.7)	
Reto	22 (20.6)	5 (23.8)	1 (11.1)	
T Stage				
T3	89 (83.2)	17 (81.0)	7 (77.8)	0.768
T4	18 (16.8)	4 (19.0)	2 (22.2)	
Número de LN avaliados (min-máx)	23 (8-98)	22 (14-78)	20 (7-49)	0.976
Invasão Linfática-Vascular				
Negativa	98 (91.6)	17 (81.0)	9 (100.0)	0.237
Positiva	9 (8.4)	4 (19.0)	0 (0.0)	
Invasão Perineural				
Negativa	101 (94.4)	17 (81.0)	4 (44.4)	< 0.001
Positiva	6 (5.6)	4 (19.0)	5 (55.6)	
Diferenciação Tumoral				
G1	5 (4.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.710
G2 + G3	102 (95.3)	21 (100.0)	9 (100.0)	
CEA préoperatório, ng/mL				
≤ 4.0	54 (56.8)	6 (40.0)	3 (33.3)	0.252
> 4.0	41 (43.2)	9 (60.0)	6 (66.7)	
Status MSI				
Proficiente	54 (83.1)	10 (90.9)	6 (100.0)	0.730
Deficiente	11 (16.9)	1 (9.1)	0 (0.0)	
Tratamento adjuvante				
Realizado	40 (37.4)	4 (19.0)	6 (66.7)	0.042
Não Realizado	67 (62.6)	17 (81.0)	3 (33.3)	

Nota 1: Dados em N° (%) ao menos que indicado de forma diferente.

Abreviações: CEA, antígeno carcinoembrionário; LN, linfonodo; MSI, instabilidade microssatélite.

A incidência de recorrência foi de 9,3%, 9,5% e 22,2% nos grupos B-TB, I-TB e A-TB, respectivamente. Os sítios de recorrência da doença foram fígado, pulmão e linfonodo no B-TB; pulmão no I-TB; e locorregional e linfonodo no grupo de A-TB (Tabela 2).

Tabela 2 - Sítios de recorrência de acordo com o agrupamento de TB.

Sítios de recorrência	Baixo TB n = 10 / 107 (9.3% / 78.1%)	Intermediário TB n = 2 / 21 (9.5% / 15.3%)	Alto TB n = 2 / 9 (22.2% / 6.6%)
Locorregional	0 (0%)	0 (0%)	1 (11.1%)
Linfonodos	2 (1.9%)	0 (0%)	1 (11.1%)
Fígado	6 (5.6%)	0 (0%)	0 (0%)
Pulmão	2 (1.9%)	2 (9.5%)	0 (0%)
Recorrência Total	10 (9.3%)	2 (9.5%)	2 (22.2%)

Nota 2: Dados em N° (%) ao menos que indicado de forma diferente.
Abreviações: TB, tumor budding.

- **Análise SLR**

A estimativa de SLR por Kaplan Meier em cinco anos dos grupos de TB baixo, intermediário e alto foi de 98%, 88,3% e 66,7%, respectivamente (Valor p 0,160), Figura 3; Quando agrupamos o I-TB com A-TB (21,9% da amostra) observa-se uma taxa de 88,3% neste grupo (I + A-TB) versus 98% no grupo B-TB (Valor p 0,057) Figura 4.

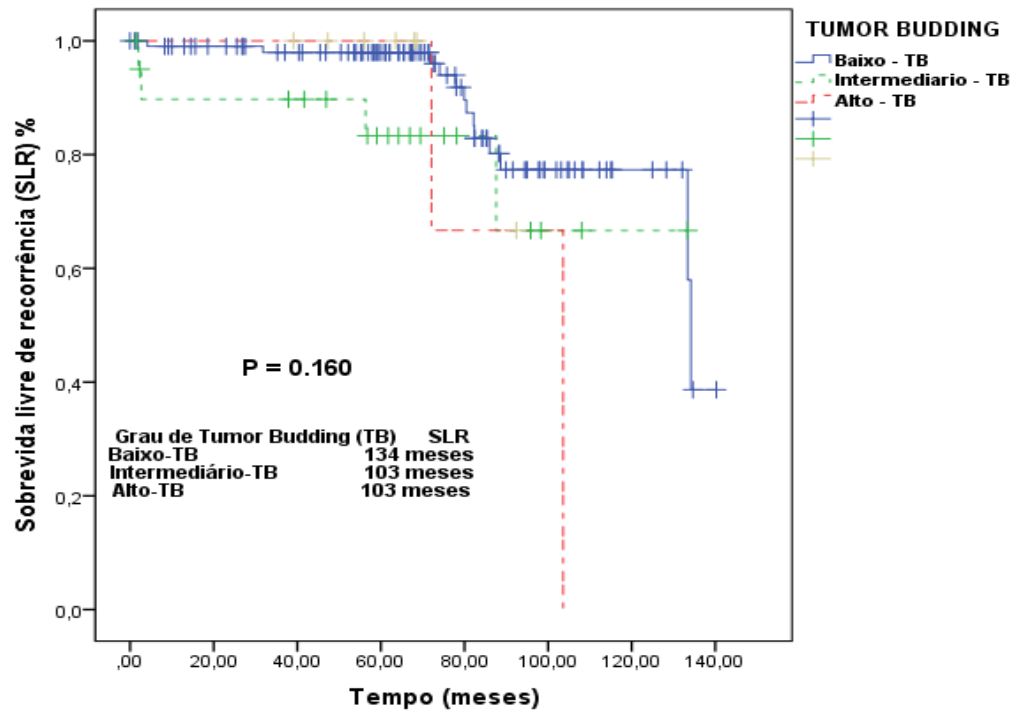


Figura 3 - Sobrevida livre de recorrência: Baixo-TB versus Intermediário-TB versus Alto-TB.

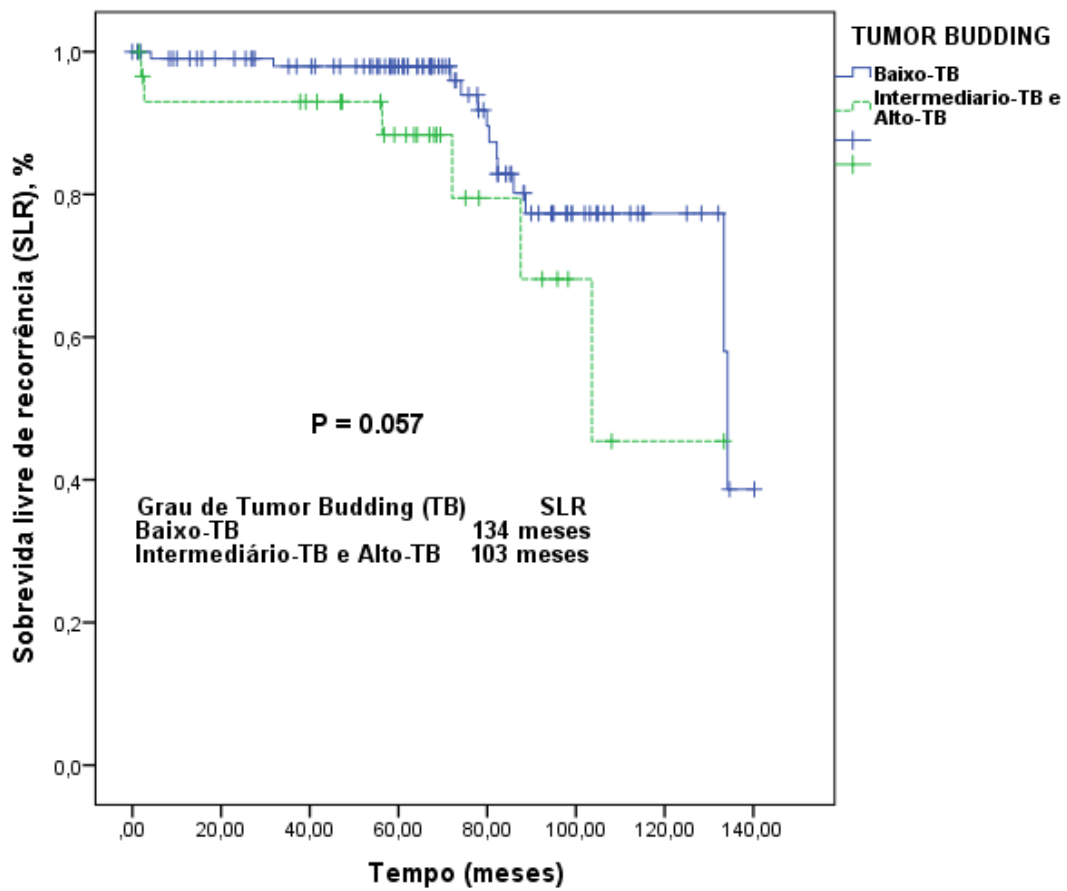


Figura 4 - Sobrevida livre de recorrência: Baixo-TB versus Intermediário-TB e Alto-TB.

- ***Fatores prognósticos significativos para SLR***

Desta forma, os grupos I-TB e A-TB, quando agrupados, foram marginalmente associados à SLR com base na análise univariada usando o modelo de regressão Cox (HR 2,54; p 0,067). Entre os outros fatores prognósticos pré-especificados, o índice Charlson superior a seis e não ter realizado terapia sistêmica adjuvante foram correlacionados com SLR (Tabela 3). Outros fatores não foram significativos, incluindo T4, lateralidade, invasão linfática-vascular, invasão perineural e grau histológico. A análise multivariada foi realizada com base nas variáveis que apresentaram valor p inferior a 0,10 no modelo univariado, sendo elas: Tumor Budding, Índice de Charlson, Idade e Realização de tratamento sistêmico. A variável T4 teve entrada forçada, por ser uma variável conhecidamente influente neste cenário. Assim, a análise multivariada revelou que TB intermediário e alto (HR, 2,6; 95% CI 0,9 a 7,1; P = 0,05) além de não realizar terapia sistêmica adjuvante (HR, 3,7; 95% CI 1,2 a 11,3; P = 0,02) foram independentemente relacionados ao SLR (Tabela 3).

Tabela 3 - Modelo univariado e multivariado de regressão de Cox para Sobrevida Livre de Recorrência.

		<u>Univariado</u>		<u>Multivariado</u>	
Paramêtros	No.	HR (IC 95%)	P	HR (IC 95%)	P
Tumor Budding					
Baixo TB	107	1		1	
I + A TB	30	2.54 (0.93-6.90)	0.067	2.61 (0.96-7.11)	0.059
Índice de Charlson					
≤ 6.0	110	1		1	
> 6.0	27	3.48 (1.20-10.0)	0.021	2.47 (0.81-7.46)	0.109
Lateralidade					
Cólon direito	38	1			
Cólon esquerdo	71	0.98 (0.34-2.82)	0.978		
Reto	28	0.34 (0.03-3.05)	0.338		
Idade	137	1.03 (0.99-1.08)	0.091	1.01 (0.96-1.06)	0.695
T Stage					
T3	113	1		1	
T4	24	0.84 (0.24-2.93)	0.787	1.56 (0.35-6.93)	0.553
Invasão Linfática-Vascular					
Negativa	124	1			
Positiva	13	0.38 (0.05-2.93)	0.357		
Invasão Perineural					
Negativa	122	1			
Positiva	15	1.14 (0.32-4.01)	0.832		
Diferenciação Tumoral					
G2 + G3	132	1			
G1	5	0.78 (0.09-6.46)	0.821		
Status MSI*					
Proficiente	70	1			
Deficiente	12	0.58 (0.07-4.57)	0.613		
Tratamento adjuvante					
Realizado	87	1		1	
Não realizado	50	0.27 (0.09-0.82)	0.022	3.73 (1.22-11.3)	0.020

Nota 3: Dados em No. (%) ao menos que indicado de forma diferente.

Abreviações: HR, hazard ratio; LN, linfonodo; MSI, instabilidade microssatélite. * 82 amostras foram analisadas para instabilidade microssatélite.

6 DISCUSSÃO

Nesta série retrospectiva de pacientes operados consecutivamente com CCR estágio II, na análise utilizando a classificação patológica do ITBCC, I-TB e A-TB, agrupados, foi significativa e independentemente relacionado a SLR, com 2,6 vezes mais chance de recidiva da doença. Enquanto pacientes cujo CCR com A-TB foram tumores mais associados com invasão perineural, o A-TB não foi associado a outras características prognósticas, como tumores pT4. Os esquemas de terapia sistêmica adjuvante dos cinquenta pacientes que os realizaram foram a base de fluorouracil, porém, nove pacientes realizaram protocolos que incluíam oxaliplatina.

A avaliação do TB em CCR teve início em populações orientais e incluíam pacientes de todos os estádios da doença. Em estudo publicado em 1993, analisou o TB em 663 pacientes japoneses, com CCR estágio I a III, com procedimentos cirúrgicos realizados entre 1970 a 1985. Sua análise foi realizada com hematoxilina-eosina e conceituou *budding* como um aglomerado de 1 a 4 células, com a classificação de negativo/leve versus moderado/grave. Os resultados mostraram que TB moderado/grave estava associado a 7.27 vezes maior chance de ocorrência para metástases, OR 7.27 (4.93 a 10.73), e um OR 9.83 (6.60 a 14.64) para recorrência local ou a distância ⁵⁷. Outro estudo que incluiu 182 pacientes com CCR estágio I e II, a análise de TB foi baseada na avaliação de imunohistoquímica. Neste estudo, eles dividiram os pacientes entre os que apresentavam 0 a 24 *buds* versus os que apresentavam 25 ou mais *buds*. O maior número de *budding* foi associado a um OR 9.07 (3.13 a 26.28) para ocorrência de recidiva local ou a distância ⁵⁸.

Nossos dados são consistentes com dados de publicações anteriores que identificaram o TB como fator prognóstico para SLR no CCR estágio II ^{40,44,46,56,57,58}. Em nosso conhecimento, este estudo representa a maior série de TB em pacientes ocidentais com CCR estágio II de acordo com a nova classificação internacional de TB.

O ITBCC 2016 foi um marco para a análise de tumores iniciais em CRC. Após a padronização sugerida pelo consenso, os laudos anatomopatológicos trazem obrigatoriamente a análise padronizada do tumor *budding*, importante ferramenta de estratificação de risco para recorrência e ocorrência de metástase.

O estudo SACURA ⁵⁹, publicado em 2018, também avaliou o TB de acordo com a classificação do ITBCC 2016. Eles examinaram a influência do TB nos desfechos relacionados

ao tumor entre 991 pacientes japoneses com CCR estágio II. Diferentemente dos nossos achados, o estudo SACURA observou que o estágio patológico T4 e a invasão linfática vascular positiva estavam associadas ao A-TB. A avaliação da invasão perineural não foi realizada no estudo SACURA. Em nosso estudo, a invasão perineural positiva foi associada ao A-TB. Em nossa análise, lateralidade não se mostrou um fator relacionado a sobrevida livre de recidiva. Tanto no SACURA quanto no nosso estudo, não houve associação entre lateralidade e TB. Da mesma forma, a recidiva do tumor ocorreu em quase 25% e 22% dos pacientes com A-TB no SACURA e no nosso estudo, respectivamente, em um período de seguimento semelhante (60 e 69 meses, respectivamente).

Quanto à sobrevida, os pacientes com I-TB e A-TB incluídos no SACURA alcançaram SLR em 5 anos de 85,1% e 74,4%, respectivamente. Em nossa população, o agrupamento de pacientes com I-TB e A-TB alcançou uma taxa de SLR de 5 anos de 66,7%. Tais diferenças nos resultados entre nossa amostra de pacientes ocidentais e o estudo japonês podem refletir diferenças desconhecidas no prognóstico entre as populações ou por causa de nossa amostra mais reduzida.

Uma análise posterior, não planejada, do TB de pacientes com CCR estágio II incluídos no estudo QUASAR alcançou uma amostra de 979 pacientes. Este estudo investigou o papel adjuvante do 5FU na doença em estágio II ⁵⁰. Apesar de não utilizar a nova classificação ITBCC, em um seguimento de 120 meses, dos 979 pacientes, houve 35% de recidiva da doença em pacientes com alto grau de *buds* (alto grau definido como acima de 10 *buds* por campo de 1,23/mm³) e, segundo o estudo, houve uma tendência não significativa para o aumento da eficácia da quimioterapia no grupo com maior número de *buds* ($P = 0,12$). Dado o pequeno número de eventos de recidiva em nosso estudo, não foi possível examinar se a quimioterapia adjuvante diminuiu a recorrência em pacientes com I-TB e A-TB.

O TB, definido como células únicas ou pequenos grupos de até cinco células tumorais no *front* invasivo do tumor, é um fenômeno histológico bem documentado no CCR e é considerado o primeiro passo no processo de metástase da doença ^{60,61,62}. Estudos comparando o perfil molecular das células do *budding* com as células tumorais centrais mostraram diferenças em relação a expressão de proteínas de adesão celular ^{63,64}. Um estudo utilizando sequenciamento de RNA mostrou a predominância do tipo molecular epitelial nas células centrais do tumor, enquanto as células do *budding* mostravam um perfil molecular mesenquimal, indicando que o fundo molecular não é constante em todo o tumor ⁶⁵.

Avanços em técnicas de sequenciamento abriram uma nova porta para identificar biomarcadores específicos, criando uma plataforma de medicina personalizada no CCR. Na

doença avançada, vias de ativação celular por mutações nos oncogenes *RAS*, *RAF*, e ampliações em *EGFR*, *ERBB2* e *MET* possibilitaram formular estratégias de terapias alvo^{66,67}. O MSI desempenha papel preditivo e prognóstico importante em CCR. Estudos em cenário adjuvante mostram que MSI-H (alta instabilidade microssatélite) não responde bem a terapia adjuvante, ao contrário de pacientes que são MSS (estabilidade microssatélite). Em estudo retrospectivo com 59.475 pacientes com CCR estágio II, pacientes com MSS tiveram benefício em terapia adjuvante com impacto em sobrevida (HR 0.54, IC 95% 0.43-0.70; $p < 0.001$). Em contrapartida, não houve benefício em sobrevida com o uso de quimioterapia adjuvante em pacientes com MSI-H (HR 0.81, IC 95% 0.38-1.78; $p < 0.595$)⁶⁸. Em nosso estudo, a análise de MSI não foi realizada em todos os pacientes; na análise univariada não se relacionou a SLR.

Na avaliação da doença localizada, além do TB, diversas outras estratégias estão sendo testadas como possíveis fatores prognósticos e preditivos de recidiva no CCR estágio II, justamente para auxiliar na decisão da quimioterapia adjuvante nesse cenário. Plataformas genéticas, avaliações moleculares de DNA tumoral circulante (ctDNA), expressão imunohistoquímica de CDX2, immunoscore, dentre outros.

Nosso estudo é limitado por seu desenho retrospectivo, embora o viés de seleção possa ter sido mínimo porque registramos todos os pacientes consecutivos no nosso banco de dados cirúrgico. O perfil de instabilidade microssatélite foi realizado em 59.8% dos pacientes; sua avaliação se tornou protocolo padrão nos últimos anos e, infelizmente, não pudemos reavaliá-lo durante nossa revisão patológica devido a restrições orçamentárias. Aspectos positivos do nosso estudo incluem uma amostra consecutiva de pacientes, um longo seguimento dos pacientes, revisão patológica de todos os casos por dois patologistas, e traz dados importantes sobre o TB em pacientes com CCR em uma população ocidental.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, I-TB e A-TB foram associados com pior SLR em relação a B-TB em pacientes com CCR estágio II. O A-TB também foi associado a uma maior taxa de invasão perineural. O TB deve ser avaliado e sistematicamente discutido como um possível fator de risco para recorrência da doença em pacientes com CCR EC II. No entanto, a recomendação de quimioterapia adjuvante baseada no TB deve ser avaliada em estudos maiores.

8 REFERÊNCIAS

- 1 Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa/2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2020. Disponível em: <https://bit.ly/3ftNPYH>. [2020 jan 12]
- 2 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30.
- 3 Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 2017 Apr;66(4):683-91.
- 4 Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Greenamyre J, et al. The increasing incidence of young-onset colorectal cancer: a call to action. *Mayo Clin Proc*. 2014 Feb;89(2):216-24.
- 5 Doubeni CA, Laiyemo AO, Major JM, Schootman M, Lian M, Park Y, et al. Socioeconomic status and the risk of colorectal cancer: an analysis of more than a half million adults in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Cancer*. 2012 Jul 15;118(14):3636-44.
- 6 Medeiros HJ. Relacionamento entre câncer colorretal e indicadores socioeconômicos no município de São Paulo: uso de modelos de regressão espacial. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2015.
- 7 Sloothaak DA, Sahami S, van der Zaag-Loonen HJ, van der Zaag ES, Tanis PJ, Bemelman WA, et al. The prognostic value of micrometastases and isolated tumour cells in histologically negative lymph nodes of patients with colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Mar;40(3):263-9.
- 8 Wolf AMD, Fontham ETH, Church TR, Flowers CR, Guerra CE, LaMonte SJ, et al. Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jul;68(4):250-281.
- 9 Choi JY, Jung SA, Shim KN, Cho WY, Keum B, Byeon JS, et al. Meta-analysis of predictive clinicopathologic factors for lymph node metastasis in patients with early colorectal carcinoma. *J Korean Med Sci*. 2015 Apr;30(4):398-406.

- 10 Choi DH, Sohn DK, Chang HJ, Lim SB, Choi HS, Jeong SY. Indications for subsequent surgery after endoscopic resection of submucosally invasive colorectal carcinomas: a prospective cohort study. *Dis Colon Rectum*. 2009 Mar;52(3):438-45.
- 11 Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, et al. Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society. *CA Cancer J Clin*. 2006 May-Jun;56(3):143-59; quiz 184-5.
- 12 Corley DA, Jensen CD, Marks AR, Zhao WK, Lee JK, Doubeni CA, et al. Adenoma detection rate and risk of colorectal cancer and death. *N Engl J Med*. 2014 Apr 3;370(14):1298-306.
- 13 Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):1977-81.
- 14 Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *Cancer Staging Manual-American Joint Committee on Cancer-AJCC*. 7th ed. New York: Springer; 2010. p.143.
- 15 Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2008 May;51(5):503-7.
- 16 Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. 2012 Sep;107(9):1315-29; quiz 1314, 1330.
- 17 Higuchi T, Sugihara K, Jass JR. Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology*. 2005 Jul;47(1):32-40.
- 18 Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas: a distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 1990 Jun;14(6):524-37.
- 19 Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Egoavil C, Juárez M, et al. Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jun;11(6):705-11; quiz e46.
- 20 Gupta S, Lieberman D, Anderson JC, Burke CA, Dominitz JA, Kaltenbach T, et al. Recommendations for follow-up after colonoscopy and polypectomy: a consensus update by the us multi-society task force on colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2020 Mar;158(4):1131-1153.e5.

- 21 Gunderson LL, Jessup JM, Sargent DJ, Greene FL, Stewart AK. Revised TN categorization for colon cancer based on national survival outcomes data. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 10;28(2):264-71.
- 22 Argiles G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2020 Jul 10:S0923-7534(20)39932-4.
- 23 O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Oct 6;96(19):1420-5.
- 24 Quah HM, Chou JF, Gonen M, Shia J, Schrag D, Landmann RG, et al. Identification of patients with high-risk stage II colon cancer for adjuvant therapy. *Dis Colon Rectum*. 2008 May;51(5):503-7.
- 25 Swanson RS, Compton CC, Stewart AK, Bland KI. The prognosis of T3N0 colon cancer is dependent on the number of lymph nodes examined. *Ann Surg Oncol*. 2003 Jan-Feb;10(1):65-71.
- 26 Le Voyer TE, Sigurdson ER, Hanlon AL, Mayer RJ, Macdonald JS, Catalano PJ, et al. Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089. *J Clin Oncol*. 2003 Aug 1;21(15):2912-9.
- 27 Michelassi F, Ayala JJ, Balestracci T, Goldberg R, Chappell R, Block GE. Verification of a new clinicopathologic staging system for colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg*. 1991 Jul;214(1):11-8.
- 28 Yun JA, Kim HC, Kim SH, Cho YB, Yun SH, Lee WY, et al. Prognostic significance of perineural invasion in stage IIA colon cancer. *ANZ J Surg*. 2016 Dec;86(12):1007-1013.
- 29 Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, Haller DG, Laurie JA, Tangen CM, et al. Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J Clin Oncol*. 1995 Dec;13(12):2936-43.
- 30 Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE, Fisher B, Glass A, Lawrence W, et al. The prognostic significance of tumor location and bowel obstruction in Dukes B and C colorectal cancer. Findings from the NSABP clinical trials. *Ann Surg*. 1983 Dec;198(6):743-52.

- 31 André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3109-16.
- 32 Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017 Feb 1;3(2):211-219.
- 33 Li Y, Feng Y, Dai W, Li Q, Cai S, Peng J. Prognostic effect of tumor sidedness in colorectal cancer: A SEER-based analysis. *Clin Colorectal Cancer*. 2019 Mar;18(1):e104-e116.
- 34 Weiss JM, Pfau PR, O'Connor ES, King J, LoConte N, Kennedy G, et al. Mortality by stage for right- versus left-sided colon cancer: analysis of surveillance, epidemiology, and end results--Medicare data. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 20;29(33):4401-9.
- 35 Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Ann Surg Oncol*. 2008 Sep;15(9):2388-94.
- 36 Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet*. 1994 Mar;6(3):273-81.
- 37 Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993 May 7;260(5109):816-9.
- 38 Cappellesso R, Luchini C, Veronese N, Lo Mele M, Rosa-Rizzotto E, Guido E, et al. Tumor budding as a risk factor for nodal metastasis in pT1 colorectal cancers: a meta-analysis. *Hum Pathol*. 2017 Jul;65:62-70.
- 39 Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2012 May 22;106(11):1713-7.
- 40 Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2016 Sep 27;115(7):831-40.
- 41 Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol*. 2017 Sep;30(9):1299-1311.

- 42 Bosch SL, Teerenstra S, de Wilt JH, Cunningham C, Nagtegaal ID. Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions. *Endoscopy*. 2013 Oct;45(10):827-34.
- 43 Petrelli F, Pezzica E, Cabiddu M, Coinu A, Borgonovo K, Ghilardi M, et al. Tumour Budding and Survival in Stage II Colorectal Cancer: a Systematic Review and Pooled Analysis. *J Gastrointest Cancer*. 2015 Sep;46(3):212-8.
- 44 Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015 Oct;39(10):1340-6.
- 45 Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2005 Aug;48(8):1597-602.
- 46 Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med (Lausanne)*. 2015 Mar 10;2:11.
- 47 Wolmark N, Rockette H, Fisher B, Wickerham DL, Redmond C, Fisher ER, et al. The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03. *J Clin Oncol*. 1993 Oct;11(10):1879-87.
- 48 André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2343-51.
- 49 Sargent DJ, Patiyil S, Yothers G, Haller DG, Gray R, Benedetti J, et al. End points for colon cancer adjuvant trials: observations and recommendations based on individual patient data from 20,898 patients enrolled onto 18 randomized trials from the ACCENT Group. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 10;25(29):4569-74.
- 50 Quasar Collaborative Group, Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, et al. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007 Dec 15;370(9604):2020-9.
- 51 Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in B2 colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials (IMPACT B2) Investigators. *J Clin Oncol*. 1999 May;17(5):1356-63.

- 52 Smith RE, Colangelo L, Wieand HS, Begovic M, Wolmark N. Randomized trial of adjuvant therapy in colon carcinoma: 10-year results of NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Aug 4;96(15):1128-32.
- 53 Wolmark N, Colangelo L, Wieand S. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trials in colon cancer. *Semin Oncol.* 2001 Feb;28(1 Suppl 1):9-13.
- 54 Wolmark N, Rockette H, Wickerham DL, Fisher B, Redmond C, Fisher ER, et al. Adjuvant therapy of Dukes' A, B, and C adenocarcinoma of the colon with portal-vein fluorouracil hepatic infusion: preliminary results of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-02. *J Clin Oncol.* 1990 Sep;8(9):1466-75.
- 55 Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology.* 2002 Feb;40(2):127-32.
- 56 Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, et al. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012 Nov;19(12):3706-12.
- 57 Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993 Jul;36(7):627-35.
- 58 Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2005 Jul;47(1):17-24.
- 59 Ueno H, Ishiguro M, Nakatani E, Ishikawa T, Uetake H, Matsuda C, et al. Prospective Multicenter Study on the Prognostic and Predictive Impact of Tumor Budding in Stage II Colon Cancer: Results From the SACURA Trial. *J Clin Oncol.* 2019 Aug 1;37(22):1886-1894.
- 60 Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2012 Feb;36(2):193-201.
- 61 Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Terracciano L, Puppa G, Zlobec I, et al. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2013 May;44(5):697-705.
- 62 Grambsch PM, Therneau TM. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* 1994;81:515.

- 63 Bhangu A, Wood G, Mirnezami A, Darzi A, Tekkis P, Goldin R. Epithelial mesenchymal transition in colorectal cancer: Seminal role in promoting disease progression and resistance to neoadjuvant therapy. *Surg Oncol*. 2012 Dec;21(4):316-23.
- 64 Talbot LJ, Bhattacharya SD, Kuo PC. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012;3(2):117-36.
- 65 De Smedt L, Palmans S, Andel D, Govaere O, Boeckx B, Smeets D, et al. Expression profiling of budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. *Br J Cancer*. 2017 Jan 3;116(1):58-65.
- 66 Rodriguez-Salas N, Dominguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Jan;109:9-19.
- 67 Graham DM, Coyle VM, Kennedy RD, Wilson RH. Molecular subtypes and personalized therapy in metastatic colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2016;12:141-50.
- 68 Koenig JL, Toesca DAS, Harris JP, Tsai CJ, Haraldsdottir S, Lin AY, et al. Microsatellite instability and adjuvant chemotherapy in stage ii colon cancer. *Am J Clin Oncol*. 2019 Jul;42(7):573-80.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

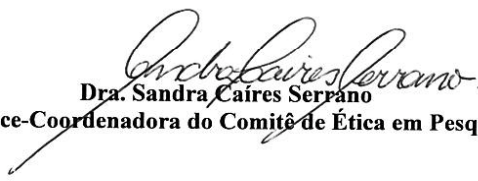
A vice coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em 19/12/2018, **aprovou “ad referendum”**, a realização do projeto nº. 2633/18 intitulado: *"Avaliação prognóstica da intensidade de achados de tumor budding em pacientes com câncer de cólon de estágio II."*

Pesquisador responsável: Rachel Simões Pimenta Riechelmann
Aluno: Augusto Leite Canguçu (Mestrado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 19 de dezembro de 2018.

Atenciosamente,


Dra. Sandra Caires Serrano

1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa