

RUI PEDRO CAETANO MOREIRA DE OLIVEIRA

**CARCINOMA COLORRETAL E METÁSTASES HEPÁTICAS
O EFEITO DO MICROAMBIENTE**

PORTO

Junho 2021

Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Porto para obtenção do grau de Doutor em Medicina, sob a orientação da Professora Doutora Maria Filomena Botelho, do Professor Doutor José Guilherme Tralhão e da Professora Doutora Fátima Carneiro.

Publicação de Nomeação do Júri da Prova de Doutoramento de

- RUI PEDRO CAETANO MOREIRA DE OLIVEIRA -

Programa Doutoral em Medicina

Nos termos do disposto do n.º 2 do art.º 18.º do Regulamento dos Terceiros Ciclos de Estudos da Universidade do Porto, a seguir se publica o júri de doutoramento em Medicina, do mestre Rui Pedro Caetano Moreira de Oliveira, nomeado por despacho vico-reitoral de 19 de março de 2021, com a tese "Carcinoma colorrectal e metástases hepáticas - o efeito do microambiente":

PRESIDENTE: Doutora Maria Leonor Martins Soares David, professora catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

VOGAIS: Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho, professora catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e orientadora da tese;

Doutor Paulo Sérgio de Matos Figueira Costa, professor catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa;

Doutora Paula Maria Ferreira Brinca Borralho Nunes, professora auxiliar convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa;

Doutor Rui Manuel Ferreira Henrique, professor catedrático convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto;

Doutor Manuel Guilherme Gonçalves Macedo, professor catedrático convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto;

Licenciada Maria Augusta Gomes Cipriano, diretora do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e especialista na área.

Porto, 23 de março de 2021.

O Membro do Conselho Executivo da Faculdade


(Doutor Bernardo Manuel de Sousa Pinto)

PROFESSORES CATEDRÁTICOS EFETIVOS

(POR ANTIGUIDADE)

MARIA AMELIA DUARTE FERREIRA
PATRÍCIO MANUEL VIEIRA ARAÚJO SOARES SILVA
ALBERTO MANUEL BARROS DA SILVA
JOSE HENRIQUE DIAS PINTO DE BARROS
MARIA FÁTIMA MACHADO HENRIQUES CARNEIRO
MARIA DULCE CORDEIRO MADEIRA
ALTAMIRO MANUEL RODRIGUES COSTA PEREIRA
MANUEL JESUS FALCAO PESTANA VASCONCELOS
JOÃO FRANCISCO MONTENEGRO ANDRADE LIMA
BERNARDES
MARIA LEONOR MARTINS SOARES DAVID
RUI MANUEL LOPES NUNES
JOSE MANUEL PEREIRA DIAS DE CASTRO LOPES
ANTÓNIO ALBINO COELHO MARQUES ABRANTES
TEIXEIRA
JOAQUIM ADELINO CORREIA FERREIRA LEITE MOREIRA
RAQUEL ÂNGELA SILVA SOARES LINO
RUI MANUEL BENTO DE ALMEIDA COELHO

PROFESSORES CATEDRÁTICOS JUBILADOS E APOSENTADOS

NOME	SITUAÇÃO
ALEXANDRE ALBERTO GUERRA SOUSA PINTO	Aposentado
ÁLVARO JERONIMO LEAL MACHADO DE AGUIAR	Jubilado
ANTONIO AUGUSTO LOPES VAZ	Jubilado
ANTÓNIO CARLOS DE FREITAS RIBEIRO SARAIVA	Jubilado
ANTÓNIO CARVALHO ALMEIDA COIMBRA	Jubilado
ANTÓNIO FERNANDES OLIVEIRA BARBOSA RIBEIRO BRAGA	Jubilado
ANTÓNIO JOSÉ PACHECO PALHA	Jubilado
ANTÓNIO MANUEL SAMPAIO DE ARAÚJO TEIXEIRA	Jubilado
BELMIRO DOS SANTOS PATRICIO	Jubilado
CÂNDIDO ALVES HIPÓLITO REIS	Jubilado
CARLOS RODRIGO MAGALHÃES RAMALHÃO	Aposentado
CASSIANO PENA DE ABREU E LIMA	Aposentado
DEOLINDA MARIA VALENTE ALVES LIMA TEIXEIRA	Aposentada
EDUARDO JORGE CUNHA RODRIGUES PEREIRA	Jubilado
FERNANDO TAVARELA VELOSO	Aposentado
FRANCISCO FERNANDO ROCHA GONÇALVES	Jubilado
HENRIQUE JOSÉ FERREIRA GONÇALVES LECOUR DE MENEZES	Jubilado
ISABEL MARIA AMORIM PEREIRA RAMOS	Jubilado
JORGE MANUEL MERGULHAO CASTRO TAVARES	Jubilado
JOSÉ AGOSTINHO MARQUES LOPES	Jubilado
JOSE CARLOS NEVES DA CUNHA AREIAS	Jubilado
JOSÉ CARVALHO DE OLIVEIRA	Jubilado
JOSÉ EDUARDO TORRES ECKENROTH GUIMARÃES	Jubilado
JOSÉ FERNANDO BARROS CASTRO CORREIA	Jubilado
JOSÉ LUÍS MEDINA VIEIRA	Jubilado
JOSÉ MANUEL COSTA MESQUITA GUIMARÃES	Aposentado
JOSÉ MANUEL LOPES TEIXEIRA AMARANTE	Jubilado
LEVI EUGÉNIO RIBEIRO GUERRA	Jubilado
LUÍS ALBERTO MARTINS GOMES DE ALMEIDA	Jubilado
MANUEL ALBERTO COIMBRA SOBRINHO SIMÕES	Jubilado
MANUEL ANTÓNIO CALDEIRA PAIS CLEMENTE	Jubilado
MANUEL AUGUSTO CARDOSO DE OLIVEIRA	Aposentado
MANUEL MACHADO RODRIGUES GOMES	Aposentado
MANUEL MARIA PAULA BARBOSA	Aposentado
MARIA DA CONCEIÇÃO FERNANDES MARQUES MAGALHÃES	Jubilado
MARIA ISABEL AMORIM DE AZEVEDO	Aposentado
RUI MANUEL ALMEIDA MOTA CARDOSO	Jubilado
SERAFIM CORREIA PINTO GUIMARÃES	Jubilado
VALDEMAR MIGUEL BOTELHO DOS SANTOS CARDOSO	Jubilado
WALTER FRIEDRICH ALFRED OSSWALD	Aposentado

"Biology is King, selection of cases is Queen, and the technical details of surgical procedures are princes and princesses of the realm who frequently try to overthrow the powerful forces of the King and Queen, usually to no long-term avail, although with some temporary apparent victories."

Cady B. Basic principles in surgical oncology. Arch Surg. 1997;132:338-46.

"It is more important to know what sort of person has a disease than to know what sort of disease a person has"

Hipócrates

AGRADECIMENTOS

O presente Trabalho não seria possível sem uma estreita colaboração e apoio múltiplos. Pretendo deixar nestas páginas os agradecimentos às pessoas que, significativamente, contribuíram para a concretização deste projeto, ao qual dediquei parte da minha vida, na impossibilidade de nomear todos aqueles que se mantiveram presentes.

À Professora Doutora Filomena Botelho, digníssima Professora Catedrática de Biofísica e Diretora do Instituto de Biofísica/Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, orientadora deste trabalho, deixo o meu sincero agradecimento por, em 2007, me ter acolhido, ainda um pupilo sonhador em Medicina, para iniciar a minha tese de Mestrado. A simpatia e simplicidade com que me recebeu no seu instituto ficarão para sempre como exemplo que pretendo seguir onde a vida me levar. Essa Mestría foi fundamental para impulsionar e desenvolver o meu apetite (latente, mas bem presente) pelas ciências básicas, ensinando-me a conciliar tarefas laboratoriais com atividade científica, instrução que carrego para a vida. Estavam dados os primeiros passos, para um projeto maior, que de certa forma, culmina nesta tese de Doutoramento. O seu exemplo de dedicação ao outro e ao conhecimento praticado com seriedade é cativante e será sempre uma fonte de inspiração. Terá sempre o meu respeito, dívida e gratidão.

Ao Professor Doutor José Guilherme Tralhão, digníssimo Professor Catedrático de Cirurgia e Diretor do Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, coorientador desta monografia, agradeço o apoio, paciência e sábios conselhos. O seu brio como médico e investigador tornam-no num exemplo a seguir. É um Ser Humano e um profissional de excelência, dedicado ao Hospital, à Faculdade e aos seus Doentes. O estímulo que confere à patologia Hepatobiliar cativa-me e desafia-me a ser melhor a cada dia que passa. A ele, fica igualmente plasmada a enorme dívida de gratidão.

À Professora Doutora Fátima Carneiro, digníssima Professora Catedrática da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Diretora do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar São João, Médica e Investigadora de renome mundial e por excelência, com todo o mérito eleita a Patologista mais influente do mundo, a quem, com muito orgulho, agradeço, reconhecendo o imensurável apoio na orientação deste projeto. A sua energia é contagiante e a projeção que confere à Anatomia Patológica é certa e soberana, conferindo-lhe vénias dos seus pares. Exemplo de mestria nas nobres Artes Médica e de Investigação cujas pegadas pretendo sempre seguir, com orgulho, por perto.

Não podia conceber a realização desta tese, sem o impulso e estímulo imensurável da Doutora Maria Augusta Cipriano, meritória Diretora do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Mentora e Amiga, figura inigualável da Anatomia Patológica e referência na área hepatobiliar. O

acolhimento e estímulo diário que dispensa, incentiva toda a sua equipa a ser melhor a cada dia que passa, sendo uma bênção. Agradeço os seus sábios conselhos, a sua paciência infinita, e todas as críticas e comentários construtivos tecidos ao longo destes trabalhos.

Agradeço profundamente aos colegas que partilharam deste processo, ao longo das suas Teses de Mestrado e Doutoramento, internatos médicos e estágios, com tarefas intercruzadas e paralelas, e que dessa forma tornaram possível o intercâmbio contínuo de opiniões, teses, hipóteses, estudos e conclusões, permitindo uma panóplia de discussões interdisciplinares que acrescentaram de forma considerável o conteúdo deste projeto, nomeadamente ao Dr. Ricardo Martins (Serviço de Cirurgia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Dr. Edgar Tavares Silva (Serviço de Urologia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Dr. João Carvalho (Serviço de Urologia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Dr. Hugo Antunes (Serviço de Urologia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Professora Doutora Maria João Carvalho (Serviço de Ginecologia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Dr. Pedro Silva Vaz (Serviço de Cirurgia – Centro Hospitalar Cova da Beira) e Dr.^a Eva Santos (Serviço de Cirurgia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra), Bem-Hajam. A minha consideração ainda pelos alunos de Medicina, os quais, que ao orientar, permitiram-me crescer no conhecimento intrínseco dos temas de interesse a esta tese, possibilitando o incremento de conhecimentos, nomeadamente ao João Martins, à Daniela Falcão e à Maria José Temido.

Um agradecimento sentido ao Professor Doutor Henrique Alexandrino, professor Auxiliar da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, de quem, para meu grande encómio, colhi doutrina, com discussão teórica e conceptualização de projetos partilhados, essenciais aos presentes trabalhos. Tudo o que nestas páginas se lê seria inconcebível sem o seu apoio e amizade. Prometo seguir com ele em prol da Ciência.

Agradeço ainda ao Dr. Pedro Amaro, Dr.^a Elisa Gravito Soares e Dr.^a Ana Torres Oliveira (Serviço de Gastroenterologia – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra) e ao Professor Doutor Filipe Caseiro Alves (Serviço de Imagem Médica – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra) pela pronta partilha de conhecimentos e cedência de imagens que complementam esta dissertação.

Não posso ainda deixar de agradecer a todos os elementos do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pelo apoio e acolhimento, sempre disponíveis para debater projetos apresentados neste âmbito e para a realização de técnicas complementares. Um agradecimento particular ao Dr. Rui Almeida, ao Dr. Mário Rui Silva, à Dr.^a. Raquel Pina, ao Dr. João Gama, à Bióloga Ana Gomes e aos Técnicos Paulo Teixeira, Ilda Simões, Salomé Pessoa, Ângela Jesus, Solange Semião, Fátima Silva, José Mário Ruivo, Paula Neto e Solange Semião. Um obrigado pela amizade e constante presença.

Ainda no que concerne ao Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, dois agradecimentos muito especiais se enaltecem, à Dr.^a Lígia Prado e Castro, ex-Diretora do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pelo apoio, incentivo e reconhecimento. Pelas suas capacidades de liderança e direção, admiráveis e exemplares. À Dr.^a Carol Marinho, Mentora e Amiga, orientadora de formação, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais prestados, pela paciência com todas as minhas “movimentações”, o seu foco foi sem dúvida essencial ao meu caminho, e, embora não se encontre atualmente a exercer funções no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, o espírito de trabalho e sacrifício que me incutiu faz-me ser um profissional muito melhor, sentindo que estará sempre presente.

Não poderia deixar incólume o apreço por todos os elementos do Instituto de Biofísica/Biomatemática pelo amparo neste projeto, nomeadamente à Doutora Mafalda Laranjo, à Doutora Salomé Pires e à Doutora Catarina Mamede. Um agradecimento muito especial e sentido à Professora Doutora Margarida Abrantes, Professora Auxiliar com Agregação, Mentora e Amiga, por todos os conselhos, partilha e infinita paciência.

Agradeço ainda ao Instituto de Imunologia da Faculdade de Medicina de Coimbra, principalmente ao Dr. Paulo Santos, pelo contributo precioso a este trabalho.

Um obrigado aos meus Amigos, por me apoiarem em todas as horas, boas e menos boas, em particular à Dr.^a Helena Lages pelo apoio e estímulo.

Um agradecimento a todos os Doentes que participaram e assim permitiram a realização destes trabalhos. Sem eles, este trabalho não faria sentido. Por eles, sempre, e com o maior respeito, desenvolvo toda a minha atividade científica.

Finalmente um reconhecimento muito devido à minha família. Aos meus pais, pelo enorme esforço com o qual me proporcionaram tudo, por acreditarem sempre em mim, fazendo de mim aquilo que sou hoje e por quem nutro uma consideração e apreço que jamais conseguirei expressar por simples palavras. À Alexandra, por todo o estímulo e apoio incondicionais. À Joana e ao Guilherme por estarem sempre aqui para mim, por serem os pilares e o porto de abrigo, pelo Amor e companheirismo, que tornam tudo mais leve, proporcionando-me a estabilidade que a produção de Ciência requer, permitindo-me ter uma vida profissional repleta e completa.

Grato!

O trabalho experimental descrito nesta tese foi realizado:

- No Serviço de Biofísica – IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- No Serviço Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
- No Serviço de Cirurgia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS E SIGLAS	3
RESUMO	7
ABSTRACT	9
PARTE I CONTEXTUALIZAÇÃO TEÓRICA	11
Capítulo I Introdução	13
1. Epidemiologia	15
2. Etiologia	16
3. Prevenção e rastreio de carcinoma colorretal	24
4. Diagnóstico e estadiamento	26
5. Lesões precursoras e lesões invasoras	28
6. Avaliação das metástases hepáticas	41
7. Avaliação de resposta à terapia	43
Capítulo II O modelo animal no estudo do carcinoma colorretal	47
1. Introdução	49
2. A importância do modelo animal	49
3. Tipos de modelos animais	50
Capítulo III Objetivos	57
Objetivos	59
Parte II TRABALHO EXPERIMENTAL	61
Capítulo IV Material e Métodos	63
1. Estudo clínico	66
1.1 Carcinoma colorretal e microambiente	66
1.2 Metástases hepáticas de carcinoma colorretal	69
1.3. Metástases hepáticas de carcinoma gástrico	76
2. Estudo pré-clínico	78
3. Procedimentos gerais	85
4. Análise estatística	88

4.1 Estudo clínico	88
4.2 Estudo pré-clínico	89
Capítulo V Resultados.....	91
1. Estudo clínico	94
1.1 Carcinoma colorretal e microambiente	94
1.2 Metástases hepáticas de carcinoma colorretal	102
1.3 Metástases hepáticas de carcinoma gástrico	111
2. Modelo animal	116
Capítulo VI Discussão.....	125
1. Carcinoma colorretal e microambiente	128
2. Metástases hepáticas de carcinoma do cólon e gástrico	132
3. Modelo animal	149
Capítulo VII Conclusões e perspectivas futuras	153
Parte III REFERÊNCIAS.....	159
Parte IV PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO ÂMBITO DA TESE DE DOUTORAMENTO	211
1. Artigos publicados em revista indexadas	213
2. Comunicações sob a forma de póster, com resumo publicado em revista indexada.....	214
3. Comunicações sob a forma de póster, sem resumo publicado em revista indexada.....	215
4. Comunicações orais, sem resumo publicado em revista indexada.....	215
5. Comunicações orais como formador	216
6. Congressos, <i>workshops</i> , simpósios e cursos.....	217
7. Prêmios	220
8. Submissão de projetos a financiamento	221

Abreviaturas e Siglas

- AFC** – Associação Francesa de Cirurgia, do francês *Association Française de Chirurgie*
- ALT** – Alanina aminotransferase, do inglês *Alanino aminotransferase*
- APC** – Polipose Adenomatosa Cólica, do inglês *Adenomatous Polyposis Coli*
- AST** – Aspartato Aminotransferase, do inglês *aspartato aminotransferase*
- bFGF** – Fator de Crescimento Básico dos Fibroblastos, do inglês *basic Fibroblast Growth Factor*
- BRAF** – Oncogene viral B1 homólogo ao sarcoma murino v-raf, do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
- BRCA** – Carcinoma da Mama, do inglês *Breast Cancer*
- CD8A** – *Cluster of Differentiation 8a*
- CD8B** – *Cluster of Differentiation 8b*
- CEA** – Antígeno Carcino-embrionário, do inglês *Carcinoembryonic Antigen*
- CHC** – Carcinoma hepatocelular
- CI** – intervalo de confiança, do inglês *confidence interval*
- CMV** – Citomegalovírus
- COX2** – Ciclooxygenase 2, do inglês *cyclooxygenase 2*
- CRC** – Carcinoma colorretal, do inglês *Colorectal carcinoma*
- CRCLM** – metástases hepáticas de carcinoma colorretal, do inglês *colorectal cancer liver metastases*
- CT** – tomografia computadorizada, do inglês *computed tomography*
- CTLA-4** – antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos, do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
- DFS** – Sobrevivência livre de doença, do inglês *disease-free survival*
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- ECOG** – *Eastern Cooperative Oncology Group*
- EDTA** – Ácido tetracético etilendiamina, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- EGFR** – Recetor do fator de crescimento epidérmico, do inglês *Epidermal growth factor receptor*
- EPCAM** – Molécula de adesão de célula epitelial, do inglês *epithelial cell adhesion molecule*
- ESMO** – Sociedade Europeia de Oncologia Médica, do inglês *European Society for Medical Oncology*
- FOLFIRI** – quimioterapia baseada em irinotecano
- FOLFOX** – quimioterapia baseada em oxaliplatina
- GCLM** – metástases hepáticas de carcinoma gástrico, do inglês *Gastric cancer liver metastases*
- GEMM** – Modelos animais geneticamente modificados, do inglês *Genetically engineered modified models*
- GlutaMAX** – *L-glutamine amino acid supplement*
- GZMA** – Granzima A, do inglês *Granzyme A*
- GZMB** – Granzima B, do inglês *Granzyme B*
- H&E** – Hematoxilina e Eosina
- HER** – Recetor epidérmico humano, do inglês *human epidermal receptor*
- HIF** – Fator induzido pela hipoxia, do inglês *Hypoxia induced factor*

HIV – Vírus da Imunodeficiência humana, do inglês *Human immunodeficiency virus*
HPV – Vírus do papiloma humano, do inglês *Human papillomavirus*
HR – taxa de risco, do inglês *Hazard Ratio*
IGF-I – Fator de crescimento da insulina I, do inglês *Insulin Growth Factor-I*
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
IFN- γ – interfer α gama
JAK-STAT – Proteínas ativadoras da transcri α o e transdutoras de sinal das cinases *Janus*, do ingl α s *Janus kinases and signal transducer and activator of transcription proteins*
JGE – jun α o gastroesof α gica
LAMP-1 – *Lysosomal-associated membrane protein 1*
KRAS – Oncogene viral hom α logo do sarcoma de rato *Kirsten*, do ingl α s *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
MACS – sele α o celular via separa α o magn α tica, do ingl α s *magnetic-activated cell sorting*
MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases*
MLH1 – *MutL homolog 1*
MMP – Metaloproteinasas da matriz, do ingl α s *matrix metalloproteinases*
MSH2 – *MutS homolog 2*
MSH6 – *MutS homolog 6*
MSI – instabilidade de microssat α lites, do ingl α s *Microsatellite instability*
MUTYH – *mutY DNA glycosylase*
NADPH – Forma reduzida fosfato de dinucle α tido de nicotinamida e adenina, do ingl α s *reducing agent of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NK – *Natural Killer*
NOS – de nenhum tipo especial, do ingl α s *Not Otherwise Specified*
NRAS – Oncogene viral hom α logo RAS do neuroblastoma, do ingl α s *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*
NS – n α o estimuladas
NTRK – Recetor da cinase neurotr α pica tropomiosina, do ingl α s *Neurotrophic tropomyosin receptor kinase*
OMS – Organiza α o Mundial da Sa α de
OS – Sobreviv α ncia global, do ingl α s *Overall Survival*
PAF – Polipose adenomatosa familiar
PBS – Tamp α o salino fosfato, do ingl α s *Phosphate Buffered Saline*
PC – padr α o de crescimento
PD-1 – Morte programada 1, do ingl α s *Programmed Death 1*
PD-L1 – Ligando da morte programada 1, do ingl α s *Programmed Death 1 ligand*
PDC – Agregados pouco diferenciados, do ingl α s *Poorly Differentiated Clusters*
PDX – Enxertos derivados de doentes, do ingl α s *Patients derived xenografts*
PI3-cinase/AKT – Fosfatidilinositol 3-cinase / Prote α ina cinase B, do ingl α s *Phosphoinositide 3-kinase / Protein Kinase B*
PMS2 – *PMS1 homolog 2*
PRF1 – Perforina 1, do ingl α s, *Perforin 1*
PTEN – Hom α logo da fosfatase e tensina, do ingl α s *Phosphatase and tensin homolog*
QTNA – Quimioterapia neoadjuvante
Rb – Retinoblastoma

rhIL-2 – interleucina-2 recombinante humana, do inglês *recombinant Human interleukin-2*

RNU – rato *Rowett Nude*

ROS – Espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SL – Síndrome de *Lynch*

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TMB – Carga mutacional tumoral, do inglês *tumour mutational burden*

TNM – *tumor-node-metastases*

TRG – Grau de regressão tumoral, do inglês *Tumor Regression Grade*

TTNI – Espessura do tumor na interface com o parênquima não tumoral, do inglês *Tumor Thickness at the tumor-Normal Interface*

uPAR – Recetor ativador do plasminogénio de tipo urocinase, do inglês *urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*

VEGF – Recetor do crescimento endotelial vascular, do inglês *Vascular Endotelial Growth Factor*

Resumo

As neoplasias malignas são mais do que um conjunto de células com alterações genéticas profundas, denotando uma interação forte com o seu microambiente. O microambiente tumoral, fruto das suas características únicas, pode funcionar como inibidor ou promotor tumoral. A modulação do microambiente tumoral, barreira à disseminação tumoral, é um processo essencial para a proliferação neoplásica, sendo um alvo terapêutico de maior importância, especialmente na era da imunoterapia. As modificações do microambiente tumoral têm implicações no fenótipo, na imuno-histoquímica e na genética das células tumorais.

Neste trabalho estudamos o microambiente tumoral e a sua influência no carcinoma colorretal primário e metastático.

Neste contexto, foi estudado o efeito do microambiente tumoral no desenvolvimento e na agressividade de carcinoma colorretal no doente imunossuprimido por transplante renal e / ou hepático.

Por outro lado, foi realizada uma análise do efeito do microambiente tumoral no desenvolvimento e na agressividade de metástases hepáticas de carcinoma colorretal, através dos seus padrões de crescimento histológicos acareando com a sobrevivência global e conseqüentes implicações clínicas. Foi realizada comparação dos padrões de crescimento histológico das metástases hepáticas de carcinoma colorretal com os padrões de crescimento histológico das metástases hepáticas de carcinoma gástrico.

Por último, foi proposto um modelo animal ortotópico de carcinoma colorretal, que pretende mimetizar o cancro colorretal do ser humano, permitindo a translação de conhecimento.

Para a concretização das tarefas propostas utilizaram-se diferentes metodologias, desde análise anátomo-patológica com recurso a imuno-histoquímica ou patologia molecular e a colheita de dados clínicos. No modelo animal recorreu-se a técnicas cirúrgicas de patologia experimental e a metodologia de medicina nuclear com um derivado dos isonitrilos marcado com Tecnécio-99m. O modelo animal utilizou células tumorais provenientes de três linhas celulares diferentes de carcinoma colorretal caracterizadas por estudos imuno-histoquímicos e de citotoxicidade.

Foi possível observar que nos casos de doentes com carcinoma colorretal após transplante hepático e / ou renal, a doença é muito agressiva, registando-se tumores com elevada percentagem de necrose, sobre-expressão de marcadores de *cancer stem cells*, baixa atividade do sistema imune, ausência de células *natural killer* e de expressão para PD-L1.

O estudo das metástases hepáticas revelou alterações fenotípicas sob a forma de padrões de crescimento histológicos, nomeadamente expansivo, infiltrativo e desmoplásico, avaliados em coloração de rotina por hematoxilina & eosina. Estes padrões de crescimento histológicos refletem distintas interações tumor / hospedeiro,

com diferentes microambientes tumorais, mais concretamente sob a forma de mecanismos de angiogénese díspares e passíveis de alvo terapêutico dirigido. Estes padrões de crescimento histológicos revelaram diferentes prognósticos e influência na sobrevivência, com o padrão de crescimento histológico de tipo desmoplásico associado a melhor sobrevivência, e o padrão de crescimento expansivo relacionado com pior prognóstico. Estes achados foram evidentes nos doentes com metástases hepáticas de carcinoma colorretal e nos doentes com metástases hepáticas de carcinoma gástrico.

No modelo animal foi realizada uma cecostomia e uma colostomia descendente com fístula cutâneo-mucosa distal, permitindo o estudo do carcinoma colorretal a nível do cólon direito e do cólon esquerdo, respetivamente. Observaram-se neoplasias de morfologia sobreponível à observada no ser humano, com invasão neural. A caracterização das linhas celulares *in vitro* revelou que as células da linha celular WiDr eram as mais agressivas, induzindo maior percentagem de neoplasias no animal bem como invasão neural. O estudo imuno-histoquímico complementar, também revelou maior agressividade das células tumorais da linha WiDr neste modelo.

Assim, com este trabalho foi possível estudar algumas características da influência do microambiente tumoral. Em doentes imunossuprimidos, uma menor atividade do sistema imune esteve associada a tumores com fenótipo mais agressivo. A limitação funcional do sistema imune nestes doentes, não possibilita uma regulação do tumor, e poderá colocar em causa determinadas terapias, mais concretamente a terapia baseada em células *Natural Killer*.

O estudo das metástases hepáticas revelou um fenótipo com implicação prognóstica, reprodutível e facilmente avaliado em coloração de rotina, que traduz uma relação tumor / microambiente própria. Os padrões de crescimento histológicos são uma ferramenta poderosa, com implicações cirúrgicas e na seleção de fármacos e que irão contribuir para a medicina individualizada. Doentes com padrão de crescimento de tipo expansivo terão pior prognóstico e beneficiarão de estratégias mais agressivas, ao passo que doentes com padrão desmoplásico poderão ser submetidos a cirurgia conservadora de parênquima e exibir melhor resposta a anti-angiogénicos.

O modelo animal revelou uma fiel reprodução da doença humana, com possibilidades do estudo do carcinoma colorretal no cólon direito ou no cólon esquerdo. A morfologia foi sobreponível à descrita no ser humano, com estabelecimento de uma via metastática importante. A correta seleção de linhas celulares, com base na sua agressividade e relação com o sistema imune em estudos *in vitro*, permitirá o uso da linha adequada, com indução de uma maior frequência de neoplasias e doença metastática, possibilitando translação de conhecimento.

Abstract

Malignant neoplasms are more than group of cells with profound genetic changes, since they also present a strong interaction with their microenvironment. The tumor microenvironment, due to its unique characteristics, can function as a tumor inhibitor or as a promoter. The modulation of the tumor microenvironment, a barrier to tumor dissemination, is an essential process for neoplastic proliferation, thus it is a therapeutic target of the greatest importance, especially in the era of immunotherapy. Modifications in the tumor microenvironment have implications in the phenotype, immunohistochemistry and genetics of tumor cells.

In this work we study the tumor microenvironment and its influence on both primary and metastatic colorectal carcinoma.

In this context, the effect of the tumor microenvironment on the development and aggressiveness of colorectal carcinoma in the immunocompromised patient due to renal and / or liver transplantation was studied.

On the other hand, an analysis of the effect of the tumor microenvironment on the development and behaviour of liver metastases from colorectal carcinoma was carried out, through its histological growth patterns affecting overall survival and consequent clinical implications. Then, a comparison of the histological growth patterns of the colorectal cancer liver metastases with the histological growth patterns of liver metastases from gastric carcinoma was performed.

Finally, an orthotopic animal model of colorectal carcinoma was proposed, which aims to mimic colorectal cancer in the human, allowing the translation of knowledge.

To accomplish the proposed tasks, different methodologies were used, from pathological analysis using immunohistochemistry and molecular pathology, to the collection of clinical data. In the animal model, we used surgical techniques of experimental pathology and nuclear medicine methodology resorting to isonitrile derivatives labeled with Technetium-99m. The animal model used three different colorectal carcinoma cell lines, all characterized by immunohistochemical and cytotoxicity studies.

It was possible to observe that in patients with colorectal carcinoma after liver and / or kidney transplantation, the disease is very aggressive, with tumors with a high percentage of necrosis, overexpression of cancer stem cells markers, low activity of the immune system and absence of natural killer cells and no expression of PD-L1.

The study of liver metastases revealed phenotypic changes in the histological growth patterns, namely expansive, infiltrative and desmoplastic, evaluated in routine hematoxylin & eosin staining. These histological growth patterns reflect different tumor / host interactions, with distinct tumor microenvironments, more specifically reflecting different angiogenesis mechanisms and therefore may be subjected to a targeted therapeutic target. These histological growth patterns revealed different prognoses and influence on survival, with the desmoplastic histological growth pattern associated with

better survival, and the expansive growth pattern was related to a worse prognosis. These findings were present in patients with liver metastases from colorectal carcinoma and in patients with gastric carcinoma liver metastases.

In the animal model, a cecostomy and a descending colostomy were performed with distal cutaneous-mucous fistula, allowing the study of colorectal carcinoma in the right colon and in the left colon, respectively. Carcinomas of overlapping morphology to the ones observed in humans were perceived in the animals, with neural invasion. The characterization of tumor cell lines *in vitro* revealed that the cells from the WiDr cell line were more aggressive, being associated with the highest percentage of carcinomas in the animals as well with neural invasion. The complementary immunohistochemical study also revealed greater aggressiveness of the tumor cells of the WiDr cell line.

Thus, with this work it was possible to study some characteristics of the influence of the tumor microenvironment. In immunocompromised patients, lower activity of the immune system was associated with tumors with a more aggressive phenotype. The functional limitation of the immune system in these patients, do not allow tumor regulation, and may preclude certain therapies, more specifically the therapy based on natural killer cells.

The study of liver metastases revealed a phenotype with prognostic implication, reproducible and easily evaluated in routine staining, which translates the tumor / microenvironment relationship. Histological growth patterns are a powerful tool, with surgical and therapeutical implications and will contribute to personalized medicine. Patients with an expansive growth pattern will have a worse prognosis and will benefit from more aggressive strategies, whereas patients with a desmoplastic pattern may be submitted to conservative parenchyma surgery and exhibit a better response to anti-angiogenics.

The animal model revealed a faithful reproduction of the human disease, with possibilities for the study of colorectal carcinoma in the right or left colon. The morphology was superimposed with the one described in humans, and established an important metastatic pathway. The correct selection of cancer cell lines, based on their aggressiveness and interaction with the immune system in *in vitro* studies, will allow the selection of the appropriate cell line, inducing a higher frequency of neoplasms with metastatic disease, ensuing knowledge translation.

Parte I

Contextualização Teórica

Capítulo I

Introdução



1. Epidemiologia

O carcinoma colorretal (CRC) representa um problema de saúde pública, sendo a quarta causa de morte relacionada com cancro¹. Em 2018, foram estimados cerca de 150.000 novos casos de CRC nos Estados Unidos da América, com cerca de 50.000 mortes², ao passo que na Europa foram registados cerca de 450.000 novos casos e 215.000 mortes³.

Existem variações na incidência de CRC a nível mundial, sendo a mais alta na Oceânia e a mais baixa na África Ocidental (figura 1). Por outro lado, quando se compara diferentes grupos étnicos, os Judeus Ashkenazi têm uma maior incidência de CRC, devido a diversas mutações genéticas^{4,5}. O género revela também diferenças, com maior percentagem de CRC na população masculina (10,9% vs. 9,5%), nomeadamente no que diz respeito ao carcinoma do reto^{6,7}. Em Portugal a incidência em 2018 foi de 58.199 casos, sendo a terceira mais elevada, após mama e próstata; a mortalidade atingiu 3.050 casos, sendo aqui a segunda mais alta, após o carcinoma do pulmão, e representando 10,5% da mortalidade relacionada com cancro⁸.

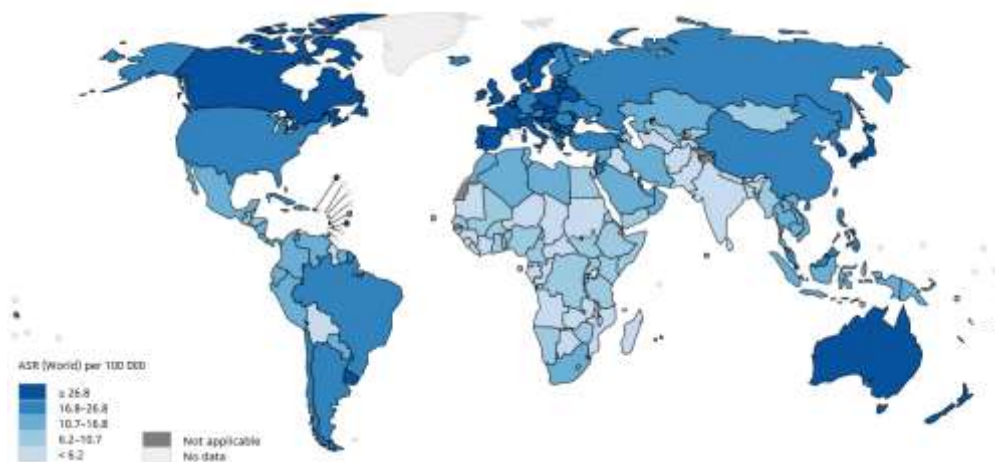


Figura 1. Mapa global da incidência de carcinoma colorretal em 2018. Fonte: GLOBOCAN

Nos últimos anos tem existido uma manutenção, e em alguns casos uma redução, da incidência e mortalidade de CRC, especialmente nos países ocidentais, provavelmente devido a uma promoção de hábitos de vida saudáveis e programas de rastreio de CRC com identificação de lesões precursoras e sua remoção⁹. No entanto, em países com história de baixa prevalência de CRC têm-se registado um aumento da incidência de CRC, principalmente à custa de mudanças de hábitos de vida^{10,11}.

Relativamente ao rastreio de CRC, é necessário ter presente que os programas não estão totalmente implementados em algumas regiões do globo¹² e que se destinam

especificamente a grupos etários particulares, sem contemplar a população mais jovem – de facto o número de CRC em doentes com idade inferior a 50 anos tem vindo a aumentar, representando atualmente uma percentagem importante de todos os doentes com CRC^{12,13}. É expectável que mesmo em regiões com baixo risco para o desenvolvimento de CRC, devido a baixa incidência de CRC na população idosa, a incidência de CRC aumente radicalmente devido ao envelhecimento de uma população jovem com fatores de risco para o desenvolvimento de CRC^{13,14}.

2. Etiologia

No que diz respeito aos fatores de risco, o CRC pode ter origem em fatores ambientais, genéticos ou mesmo de interações genéticas-ambientais¹⁵. A maioria dos CRC são esporádicos, pelo que se assume que os fatores de risco ambientais desempenham um papel importante no desenvolvimento do CRC e revelam-se um alvo atrativo para o rastreio e prevenção de cancro. A idade é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de CRC, com mais de 90% dos doentes com CRC diagnosticados após os 50 anos de idade, no entanto é um fator de risco não modificável¹⁶.

2.1 Fatores de risco ambientais

O denominado “estilo de vida ocidental” tem vindo a ser descrito com um fator major para o aumento do CRC¹⁷. Esta definição engloba obesidade, estilo de vida sedentário e dieta pobre em fibras e rica em gorduras, calorias e carne^{15,18}.

A prática de atividade física regular tem vindo a ser associada com risco diminuído de desenvolver CRC, em cerca de 20-25%, provavelmente associada a outros elementos de um estilo de vida saudável^{19,20}. Para além disso, a prática de exercício físico contínuo, mesmo de forma moderada, aumenta o metabolismo basal, promovendo uma melhor eficiência energética e diminuindo a resistência à insulina²¹.

A obesidade está normalmente associada a resistência à insulina, podendo desempenhar um papel na carcinogénese do CRC²². A hiperinsulinémia conduz à expressão de Fator de Crescimento de Insulina I (*IGF-I*, do inglês *Insulin Growth Factor*) com consequente efeito no crescimento e proliferação celular através da ativação da via celular da insulina e inibição da apoptose, fatores que podem estar associados à agressividade tumoral^{23,24}. O tecido adiposo também desempenha um papel no desenvolvimento e progressão do CRC ao produzir adipocinas como a leptina e adiponectina. Numa situação fisiológica a produção destas adipocinas está equilibrada, no entanto, num ambiente promotor de CRC existem níveis elevados de leptina e diminuídos de adiponectina, com disrupção da homeostase nomeadamente no que diz respeito às vias de sinalização PI3-cinase/AKT (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase e Protein Kinase B*) e JAK-STAT (do inglês *Janus kinases e signal transducer and activator of transcription proteins*)^{25,26}.

A obesidade está ainda ligada a um estado inflamatório crónico, normalmente de baixa intensidade, que nos últimos anos tem vindo a ser relacionado com o desenvolvimento de CRC^{27,28}. O tecido adiposo em excesso, quando integrado num estado pró-inflamatório, sofre transformações e induz uma desregulação da libertação tecidual de Interleucina 6 (IL-6), com maiores quantidades de IL-6 na circulação, o que vai provocar a ativação de vias de sinalização intracelulares e o aumento da proliferação celular²⁹⁻³¹.

O elevado consumo de carne vermelha, especialmente de vaca e cordeiro, componente típico da dieta Ocidental, está associado a alto risco de desenvolver CRC. O mecanismo potencial compreende a presença de ferro, nitritos/nitratos (utilizados no processamento de carne), aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (produzidos ao cozinhar carne a altas temperaturas), que se acreditam serem carcinogénicos³²⁻³⁵. A ingestão de gordura, presente na carne vermelha, leva ao desenvolvimento de flora bacteriana capaz de degradar sais biliares em compostos N-nitrosos potencialmente carcinogénicos³⁴.

No que concerne a fatores protetores, o consumo de quantidades elevadas de fibra, presente nos cereais e fruta, tem revelado uma diminuição do risco de desenvolver CRC, maioritariamente por diluir os carcinogénicos fecais, regular a microbiota intestinal, diminuir o pH fecal e se ligarem aos ácidos gordos carcinogénicos com formação de ácidos gordos de cadeia curta³⁶. O consumo regular de vegetais também tem um efeito protetor ao produzir glucosinolato, precursor do isotiocianato, que tem propriedades anticancerígenas³⁷. Uma dieta rica em fibras aumenta a produção de ácidos gordos de cadeia curta como o butirato produto da fermentação pela microbiota intestinal que tem um papel multifuncional nos colonócitos³⁸. O butirato fornece energia às células e desempenha um papel na homeostasia celular, atuando como um agente de prevenção primária de CRC, mas também pode inibir o crescimento tumoral e apresentar efeito sinérgico com agentes quimioterápicos (irinotecano) no tratamento do CRC, enfatizando a importância da dieta na carcinogénese e tratamento do CRC³⁹.

Os micronutrientes também desempenham um papel na prevenção do desenvolvimento do CRC, estando o consumo de vitamina C associado a menor inflamação e menor desenvolvimento de mutagénicos fecais⁴⁰. O papel de outras vitaminas, tais como a vitamina D, a vitamina B12 e ácido fólico ainda permanece em debate⁴¹.

O consumo de álcool, mesmo em quantidades moderadas, bem como tabaco estão também ligados ao desenvolvimento de CRC, com uma forte associação entre hábitos tabágicos e o carcinoma retal⁴², por aumento da inflamação⁴³. O tabaco, através do seu componente sólido (o alcatrão) e dos seus componentes iónicos (superóxido e o hidroxilo), é capaz de induzir aumento das espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e os metabolitos do tabaco, nomeadamente nitrosaminas,

atuam em recetores nicotínicos induzindo a ativação de vias de sinalização tais como a via das Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*), ciclooxigenase (COX) 2 e metaloproteinases da matriz (MMP)^{44,45}. O consumo de álcool em quantidades exageradas perturba o ambiente inflamatório e está associado a altos níveis de ROS e de NADPH (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*). Por sua vez o consumo de álcool, quando associado a carências vitamínicas e a uma dieta pobre em fibra, tem efeito nas vias celulares, especificamente na diminuição da apoptose, mas também no estímulo da proliferação celular⁴⁶⁻⁴⁸.

2.2 Fatores genéticos e epigenéticos

O CRC pode ocorrer como o resultado de uma síndrome de cancro hereditária, no entanto estas correspondem apenas a 1 a 5% de todos os CRC⁴⁹. As formas mais comuns são as síndromes que predisõem ao desenvolvimento de adenomas, nomeadamente a polipose adenomatosa familiar (PAF) e a síndrome de Lynch⁵⁰. Outras síndromes incluem a polipose associada ao gene *MUTYH* (do inglês, *mutY DNA glycosylase*)⁵¹, a polipose serreada e poliposes hamartomatosas (Peutz-Jeghers, polipose juvenil, Cronkite-Canada, entre outras)^{49,52}.

A PAF está associada a um gene localizado no cromossoma 5q22, denominado *APC (adenomatous polyposis coli)*⁵³. As funções do gene APC incluem a estabilização correta dos cromossomas para o início da anafase e a participação na via da beta-catenina. Em situações normais o gene *APC* forma um complexo com a beta-catenina e promove a sua degradação, impedindo os seus efeitos na transcrição, já em situações anómalas do gene APC, nomeadamente mutações, a beta-catenina exerce o seu efeito de promoção do crescimento, migração e angiogénese induzindo ao desenvolvimento de neoplasias⁵⁴. Os doentes com PAF têm um risco de quase 100% de desenvolver CRC⁵⁵.

A principal apresentação da PAF é sob a forma de uma polipose cólica, com mais de 100 pólipos dispersos por todo o cólon (figura 2) com início por volta da puberdade⁵⁶. Uma forma mais severa de PAF tem sido descrita, caracterizada por mais de 2000 pólipos e com início em idades mais precoces, bem como uma forma atenuada de PAF, definida por menos de 100 pólipos e aparecimento em idades mais avançadas⁵³. De realçar que esta síndrome pode exibir formações polipoides noutras localizações, nomeadamente no estômago e no duodeno, bem como manifestações extraintestinais, mais concretamente sob a forma de fibromatose desmoide⁵⁷.



Figura 2. Peça de colectomia total por polipose adenomatosa familiar (PAF). São evidentes múltiplos pólipos dispersos por todo o cólon, alguns de maiores dimensões.

A síndrome de Lynch (SL) corresponde a cerca de 1 a 3 de todos os CRC, sendo causada por mutações germinativas em um dos genes responsáveis pela reparação do DNA, mais concretamente *MLH1* (do inglês, *MutL homolog 1*), *MSH2* (do inglês *MutS homolog 2*), *MSH6* (do inglês, *MutS homolog 6*) ou *PMS2* (do inglês, *PMS1 homolog 2*), ou mutações no gene *EPCAM* (do inglês, *epithelial cell adhesion molecule*) que induz silenciamento epigenético do gene *MSH2*, e revela um padrão autossômico dominante de transmissão⁵³. As alterações nestes genes induzem a acumulação de defeitos gerados durante a replicação de DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*), tais como inserções, deleções e incompatibilidades base-base⁵⁸. Esta via de reparação do DNA está conservada de forma filogenética desde as bactérias⁵⁹, sendo que as principais proteínas envolvidas são a MutS e MutL nos animais procariontes; nos animais eucariotes o sistema funciona com o homólogo destas proteínas, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2⁶⁰. Os microssatélites, também conhecidos como curtas sequências repetidas são pequenas sequências de bases (1 a 6 pares) repetidas, dispersas ao longo de todo o genoma humano, constituindo 3% do mesmo, e que devido à sua estrutura repetida são propensas a altas taxas de mutação⁶¹. A identificação imuno-histoquímica destas alterações constitui uma ferramenta valiosa para identificar doentes e famílias com SL, visto que o risco de desenvolver CRC ao longo da vida na SL é elevado, podendo atingir 75%⁵³.

O algoritmo para a identificação imuno-histoquímica, associada a síndrome de Lynch, apresenta-se na figura 3. Há sugestão de mutação germinativa quando se observa ausência de expressão para as proteínas MSH2, MSH6 e PMS2. A perda de expressão de MLH1, isolada ou em combinação com PMS2, poderá ser mais provavelmente devida a mutação *BRAF V600E* e/ou metilação do promotor de *MLH1*. Em caso da perda de

expressão de *MLH1* deverão ser excluídas a mutação *BRAF V600E* e/ou metilação do promotor de *MLH1* antes de se considerar o diagnóstico de SL^{49,53}.

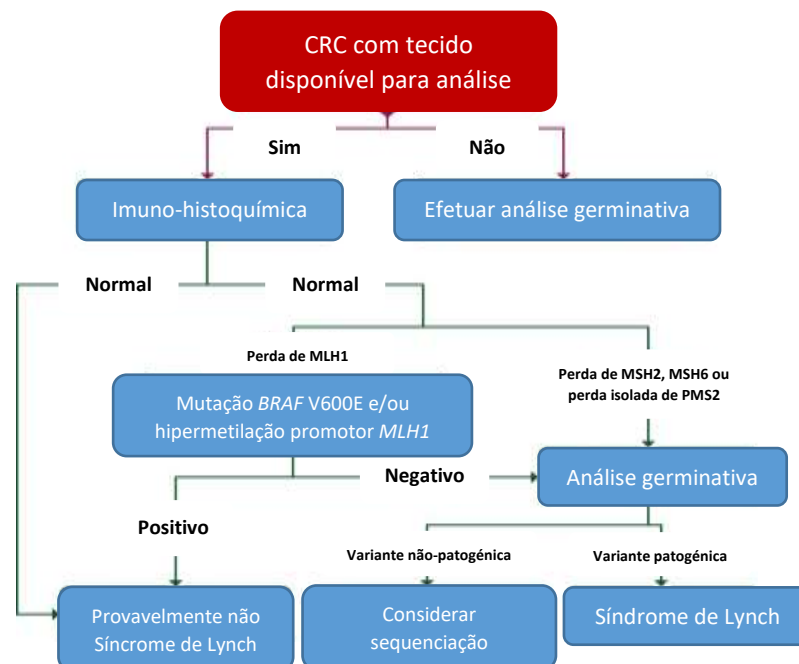


Figura 3. Algoritmo para a interpretação imuno-histoquímica das proteínas associadas com a síndrome de Lynch. Uma perda de MSH2, MSH6 e PMS2 é indicativa de alta probabilidade de mutação germinativa, enquanto uma perda de MLH1 implica testar para mutações *BRAF V600E* e/ou metilação do promotor de *MLH1*. Adaptado de Stjepanovic *et al.* (2019) Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 30: 1558–1571

De forma análoga à PAF, também a SL se pode apresentar sob a forma de manifestações extra-intestinais, com outras neoplasias, nomeadamente carcinoma do endométrio, ovário e pâncreas⁶², tumores do sistema nervoso central (síndrome de Turcot) e de lesões cutâneas, como adenomas sebáceos (síndrome de Muir-Torre)⁶³.

Das restantes síndromes associadas a CRC, a polipose associada ao gene *MUTYH* apresenta-se com um fenótipo sobreponível à PAF atenuada, embora com menor risco de manifestações extra-intestinais. A polipose associada ao gene *MUTYH* tem início na segunda e terceira década de vida e com um risco cumulativo de desenvolver CRC que pode atingir os 45%⁶⁴.

A síndrome da polipose serrada tem vindo a ganhar notoriedade e incidência nos últimos anos e apresenta um risco de desenvolver CRC que pode atingir os 30%⁶⁵. Os seus critérios de diagnóstico incluem a deteção de mais de 5 lesões serradas/pólipos proximais ao reto, todos com tamanho superior a 5 mm, e dois com mais de 10 mm; e/ou mais de 20 lesões serradas/pólipos de qualquer tamanho, com mais de 5 em localização proximal ao reto⁵³. Uma característica interessante desta síndrome é que o número de pólipos necessários para o seu diagnóstico é cumulativo⁴⁹.

As restantes síndromes são raras, mas será importante realçar a síndrome de carcinoma colorretal familiar X. Estes doentes representam cerca de 40% das famílias

que cumprem critérios para SL, mas não apresentam mutações germinativas dos genes de reparação de DNA⁶⁶.

A epigenética corresponde às alterações na expressão génica induzidas pelo ambiente, normalmente resultando de três níveis: metilação de DNA, modificação pós-translacionais das histonas e remodelação da cromatina⁶⁷. Existem várias classes de modeladores epigenéticos, classificados como “writers”, “readers” e “erasers” de acordo com a função que desempenham⁶⁸.

O efeito epigenético mais conhecido e estudado é a metilação^{68,69}. Este efeito ocorre em regiões do DNA que contêm muitos nucleótidos guaninina e citosina, regiões denominadas de ilhas CpG, normalmente não metiladas e localizadas em regiões reguladoras de genes⁶⁸. A metilação das regiões CpG conduz à inativação de genes supressores tumorais e a hipometilação induz uma transcrição aumentada de oncogenes^{70,71}. No caso específico do CRC um fenótipo metilador das ilhas CpG foi reconhecido como um subtipo molecular específico e com pior prognóstico⁷². Estes efeitos epigenéticos têm sido associados à idade, estado metabólico e fatores nutricionais, encarando desta forma a obesidade e alterações metabólicas com risco aumentado de cancro⁶⁸.

Para além do papel na iniciação tumoral, a interação epigenética tem vindo a ser descrita como um fator importante na reprogramação das células tumorais. A epigenética pode conferir plasticidade às células neoplásicas, por forma a adquirirem mutações com capacidade adaptativa e que lhes permite sobreviver num ambiente pró-inflamatório. Esse incremento na sobrevivência e motilidade, possibilita vencer barreiras físicas, com aquisição de capacidade de disseminação à distância e de resistência à terapêutica^{73,74}.

Os fármacos com potencial de causar alterações epigenéticas visam uma imunomodulação da célula tumoral. Esta imunomodulação pode induzir morte celular imunogénica, e regular epigeneticamente o sistema imune, principalmente à custa da ativação de células T CD8+, exaustas e com expressão persistente de PD-1, e supressão da atividade das células T reguladoras, e ativação de células NK (do inglês, *Natural Killer*)⁶⁷.

Estas vias de abordagem ainda carecem de determinação de concentração segura a administrar, sequência de administração e descrição correta de afeitos adversos, muitos deles dependentes da concentração utilizada. Para além disso será necessária a validação de biomarcadores preditores de eficácia terapêutica, tanto a nível tecidual como a nível do DNA tumoral circulante. Alguns painéis de assinatura epigenética têm vindo a ser desenvolvidos, tal com o MeTIL, com resultados promissores^{67,75}. Pelo exposto, a modulação epigenética tem vindo a surgir como um modificador das características imunológicas tumorais, com potencial para sensibilizar o tumor a abordagens terapêuticas imunológicas⁶⁷.

2.3 Infecções e microbiota intestinal

Algumas infecções têm vindo a ser apontadas como risco aumentado para o desenvolvimento de CRC. A infecção por *Shistosoma japonicum*, especialmente nos países orientais é aquela que está mais descrita e associada ao CRC⁷⁶. As infecções virais podem ter um papel na carcinogénese do CRC: o vírus *John Cunningham*, vírus de DNA linear de cadeia dupla, pode interagir com as vias p53 e do retinoblastoma (Rb), mas também com a via β -catenina e interferir com a expressão de c-myc⁷⁷. O vírus do Papiloma Humano (HPV) é um vírus de DNA de dupla cadeia, amplamente associado à carcinogénese que também interfere com as vias p53 e Rb, conseqüentemente com desregulação do ciclo celular e indução de imortalidade celular; no entanto os seus efeitos patogénicos estão mais associados ao desenvolvimento de carcinoma epidermoide do reto/canal anal⁷⁸. O citomegalovírus (CMV) é um vírus endémico, presente em mais de 50% da população humana que pode incitar alterações na produção de COX-2 e Bcl2 e concludentemente afetar a carcinogénese do CRC⁷⁷. No entanto, as associações entre infecções virais e o desenvolvimento de CRC não são consistentes e por vezes contraditórias, sendo necessário mais estudos neste sentido⁷⁹.

No que diz respeito ao papel da microbiota intestinal, deve ser tido em conta que o trato gastrointestinal é colonizado por milhões de microorganismos, que interagem com o hospedeiro humano, constituindo o microbioma⁸⁰. Este bioma possui um potencial biológico enorme, interferindo com o equilíbrio e função intestinal. A bibliografia suporta esta interação como benéfica, visto que o microbioma auxilia o desenvolvimento do sistema imune das mucosas, captura de nutrientes e participa na homeostase metabólica, e ainda desempenha funções na defesa contra microorganismos patogénicos^{81,82}. Apesar destas funções benéficas, alguns estudos associam o número de bactérias com o risco de desenvolvimento de CRC, o que pode explicar o maior risco de carcinomas no cólon em comparação com o intestino delgado^{83,84}. Estudos realizados recorrendo à utilização de modelos animais deram ênfase à incidência pequena de CRC em animais livres de germes e um modelo de carcinogénese tem sido proposto no qual um agente patogénico específico está associado com um determinado estágio de CRC⁸⁵. Entre as várias espécies de bactérias identificadas como potenciais promotoras de CRC, as mais referidas são *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* and *Fusobacterium ssp.*⁷⁷. A interação entre a microbiota e os carboidratos provenientes da dieta, nomeadamente na dieta ocidental rica em gordura, está associada a remodelação da microbiota e disfunção metabólica, com conseqüente indução de vias inflamatórias potentes e aumento da quantidade de fenóis e amins com compostos nitrosos, levando ao desenvolvimento de CRC⁸⁶.

As múltiplas funções da microbiota e o seu papel no desenvolvimento de CRC fazem do microbioma um alvo interessante para prevenção e tratamento de doença, no entanto apenas foram conseguidas, de forma consistente, modificações curtas da

microbiota, sendo que alterações a longo prazo parecem difíceis de obter, muito por causa dos hábitos dietéticos de longa duração⁸⁷⁻⁸⁹. Há, ainda, dificuldade em definir a constituição de uma microbiota humana saudável, devido à interação de múltiplos componentes na sua constituição tais como dieta, exercício físico, genética e ambiente⁸⁶, e deverá existir cautela nas modificações da microbiota por forma a não induzir disbiose de acordo com o princípio Anna Karenina⁹⁰. Estas questões deram origem ao Projeto do Microbioma Integrado (*Integrated Microbiome Project*) que visa caracterizar o microbioma em situações saudáveis e patológicas⁹¹, que a médio prazo deverá constituir detalhes mais aprofundados e individualizados sobre este tema.

2.4 Imunossupressão

A imunossupressão tem vindo a ser associada a um risco aumentado de desenvolver CRC, devido a uma modulação negativa do sistema imune, e consequentemente incapacidade de destruição das células tumorais. Este efeito pode ser observado em doentes com imunodeficiência primária^{92,93}, infetados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV)⁹⁴ e com supressão imune por transplantação de órgãos sólidos^{95,96}.

2.5 Radiação

A radioterapia está também associada ao aumento da incidência de CRC, especialmente carcinoma do reto e em doentes com histórico de tratamento prévio por carcinoma da próstata ou do colo uterino. Este efeito parece ser dose-dependente e normalmente o tumor desenvolve-se nas áreas irradiadas, com aumento da incidência com o tempo após exposição à radiação^{97,98}.

2.6 Intervenções cirúrgicas

Alguns procedimentos cirúrgicos acarretam risco acrescido de CRC. A ureterosigmoidostomia é uma opção cirúrgica para o tratamento de diversas condições indutoras de alterações do fluxo urinário, tal como cancro vesical, que está associada a desenvolvimento de CRC. Este risco, cerca de 10%, está associado à conversão de nitritos, presentes na urina, em nitratos pelo microbioma intestinal, no entanto normalmente só se manifesta após um longo período após o procedimento (25 anos)^{99,100}.

A recorrência anastomótica de CRC é um evento bem conhecido e descrito, que pode resultar de células tumorais esfoliadas, se o tumor é seccionado/perfurado durante a cirurgia), da invasão linfovascular, da presença margens cirúrgicas positivas, da presença de colonócitos transformados ou mesmo por etiologia infecciosa^{101,102}. Opiniões ainda são divergentes no sentido em que este tumor será uma recorrência local, doença metastática ou um segundo tumor primário, sendo que a distinção entre

estas entidades é normalmente baseada no período de tempo decorrente entre as lesões^{101,103}.

2.7 Status hormonal

Alguns autores afirmam que as hormonas sexuais desempenham um papel no desenvolvimento de CRC, suportado por efeito protetor de estrogénios em algumas coortes. No entanto, a associação é ainda controversa, e outros estudos apontam para o papel dos estrogénios como inibidores do crescimento de CRC após a fase de desenvolvimento inicial, o que poderá ser promissor e conduzir a terapêutica hormonal de forma análoga ao que acontece nos carcinomas da mama^{104,105}. Doentes acometidos por acromegália apresentam um risco acrescido de CRC, que pode ser explicado por níveis aumentados de hormona de crescimento e de IGF-I com indução da proliferação celular¹⁰⁶.

2.8 Doença inflamatória intestinal

A doença inflamatória apresenta uma grande complexidade do ponto de vista etiopatogénico¹⁰⁷ e será apenas abordada de forma sucinta, visto não ser o âmbito desta dissertação. A doença inflamatória intestinal crónica contempla dois grandes subgrupos, a doença de Crohn e a colite ulcerosa, patologias predominantemente de adultos, com uma incidência de cerca de 20/100,000¹⁰⁸. A sua patogénese é complexa, sendo mais ou menos consensual que resultam de mecanismos de lesão imunomediados e relacionados com a microbiota e influência genética multifatorial¹⁰⁹. Pelo seu contexto inflamatório crónico, ambas revelam um aumento do risco para desenvolver CRC, sendo, contudo, superior na colite ulcerosa^{110,111}. Doentes com doença de longa duração são os que exibem maior risco, sendo que geralmente o CRC associado à doença inflamatória intestinal se desenvolve em idade inferior ao CRC convencional¹¹².

3. Prevenção e rastreio de carcinoma colorretal

Apesar da elevada incidência e mortalidade do CRC, o rastreio tem demonstrado ser uma ferramenta eficaz para salvar doentes através da identificação de lesões precursoras, providenciando uma oportunidade para modalidades terapêuticas endoscópicas, evitando a abordagem cirúrgica. Esta abordagem iniciou-se no início do século XX, maioritariamente por Dukes, através do conceito de que o CRC estava associado com lesões adenomatosas, conceito mais tarde confirmado mais tarde por Morson e Vogelstein, com a teoria da sequência pólipo-carcinoma e suas respetivas mutações somáticas na década de 80¹¹³.

Atualmente o programa de rastreio do CRC está bem instituído na população, mas o uso de instrumentos data de 1895 com a sigmoidoscopia rígida, procedimento deveras desagradável na época. No entanto, o primeiro rastreio eficaz de CRC com

remoção de pólipos foi descrito em 1948 na Universidade do Minnesota. Outros métodos surgiram posteriormente, tal como deteção de sangue oculto nas fezes e a colonoscopia – permitindo a visualização e remoção de pólipos, posteriormente validados em grupos bem definidos^{113,114}. Os métodos de rastreio são dirigidos para a deteção de lesões precoces de CRC, elegíveis para intervenção curativa com elevada relação custo-benefício, e usam métodos endoscópicos e baseados em deteção fecal¹¹⁵. O objetivo maior do rastreio é a descoberta do CRC em estádios iniciais, diminuindo a carga tumoral da população, e pode ser extremamente eficaz, se os serviços possuírem a qualidade desejável¹¹⁶. Esta qualidade está diretamente relacionada com a classificação correta das lesões precursoras, manipulação dos espécimes endoscópicos e definição de invasão, entre outros, o que motivou a publicação de *guidelines* para garantir a qualidade desejável¹¹⁷.

As *guidelines* estabelecidas para rastreio de CRC são diferentes em países com população de risco intermédio e de alto risco. No que diz respeito à população de risco intermédio, o rastreio de CRC apresenta algumas variações nos limites de idade, ou seja início e fim de rastreio, principalmente devido a diferentes medianas de desenvolvimento de CRC nos vários países, mas de forma global tem início aos 45 anos e termina aos 75/80 anos. Em alguns países não há limite superior de idade^{116,118}. A colonoscopia é o *gold standard* do rastreio de CRC e deverá ser efetuada a cada 10 anos, se nenhuma lesão precursora for identificada, ou 3 a 5 anos após uma polipectomia. No entanto o caráter invasivo e agressivo deste exame é desencorajador e diminui a adesão ao rastreio, considerando-se como alternativa a realização de sigmoidoscopia flexível (FS) a cada 5 anos, seguida de colonoscopia total, no caso do resultado com a sigmoidoscopia flexível ser positivo, é uma opção válida^{116,119}. A pesquisa de sangue oculto nas fezes, de forma anual ou bianual, constitui outra opção para identificar doentes em risco para desenvolver CRC e pode representar a primeira linha de abordagem em países com baixo poder económico¹²⁰⁻¹²².

Testes não invasivos, tal como a colonografia por tomografia computadorizada (CT) a cada 5 anos, podem ser realizados em doentes que recusem outros métodos, e pode ser igualmente eficaz à colonoscopia convencional na deteção de adenomas avançados, mas perde sensibilidade e especificidade em lesões de pequenas dimensões, é dependente do operador e não permite remoção/biópsia de lesão se presente^{123,124}.

Nos últimos anos testes imuno-histoquímicos e baseados em DNA no material fecal têm emergido como opções para deteção e rastreio de CRC, aumentando a expectativa das possibilidades não invasivas para além de serem apelativos num contexto de custo-benefício¹²⁵; embora não possuam o efeito preventivo dos exames convencionais pois normalmente detetam CRC em fases avançadas da doença, podem ter aplicação na monitorização da displasia associada à doença inflamatória intestinal e no período entre colonoscopias¹²⁶⁻¹²⁸. A colonoscopia por videocápsula e enemas de

bário com duplo contraste são outras possibilidades para o rastreio de CRC, no entanto a sua eficácia não está bem descrita¹¹⁸.

No que diz respeito à prevenção de CRC, os métodos supradescritos são descritos como prevenção secundária, pois apenas são efetuados após exposição a fatores de risco para CRC e exigem uma grande variedade de recursos nomeadamente gastroenterologistas, biólogos, patologistas, imagiologistas, entre outros, e em doentes com pequena incidência de CRC, o rastreio poderia ser mais incidente em doentes com elevado risco de desenvolver, aumentando assim a sua eficiência¹³. É neste contexto que surge a chamada prevenção primária, com ênfase na redução dos fatores de risco de CRC e consequentemente evitar o seu desenvolvimento. A modificação dos hábitos alimentares e promoção de um estilo de vida saudável, com consumo moderado de álcool, cessação tabágica e prática regular de exercício físico são exemplos desta prevenção e devem ser implementados¹²⁹.

Recentemente emergiu um novo conceito de prevenção do CRC. Vários estudos demonstraram que o consumo de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), nomeadamente aspirina, reduz o risco de desenvolver CRC, originando a denominada “quimioprevenção”^{13,130}. Este contexto é muito apelativo, visto que a aspirina é um anti-inflamatório de baixo custo e poderia ser rapidamente introduzido em países com baixo poder económico. No entanto, os efeitos secundários da toma prolongada de aspirina, nomeadamente renais, cardiovasculares e gastrointestinais, apresentam-se como a principal desvantagem desta estratégia¹³¹. Apesar desses efeitos indesejáveis o uso de aspirina é recomendado para prevenção primária de CRC em doentes com risco intermédio pela “*United States Multi Society Task Force on Colorectal Cancer*”¹³². Outros fármacos, tal como o celecoxib, têm surgido como potenciais redutores do risco de desenvolver pólipos em doentes com PAF¹³³ e o uso de estatinas têm demonstrado resultados contraditórios¹³.

4. Diagnóstico e estadiamento

Atualmente o diagnóstico de CRC é efetuado no contexto de um exame clínico por sintomas tais como alterações nos hábitos intestinais, dor abdominal, perda de peso e anemia¹³⁴. A apresentação clínica é altamente dependente da localização do tumor e respetivo estágio, mas normalmente, no decorrer da investigação clínica, colonoscopia é efetuada e providencia identificação e morfologia da lesão (figura 4), bem como amostragem para estudo anátomo-patológico, sendo igualmente importante para deteção de lesões síncronas¹³⁴.



Figura 4. Pólipo pediculado do cólon ascendente (lado esquerdo) – o estudo histológico revelou um adenoma tubular com displasia de baixo grau – imagem endoscópica cedida gentilmente por Dr.^a Ana Oliveira; do lado direito é evidente uma lesão com maior complexidade, com padrão vascular aberrante e hemorragia, com área central escavada – o estudo histológico correspondia a um adenocarcinoma invasor, num doente com síndrome de *Lynch* – imagem endoscópica cedida amavelmente por Dr. Pedro Amaro e Dr.^a Elisa Gravito Soares.

A determinação sérica do antigénio carcinoembrionário (CEA), atualmente designado como CEACAM5, é efetuada por rotina em doentes assintomáticos como um marcador para a deteção de CRC, no entanto não possui a especificidade e sensibilidade desejadas, visto que é produzido por quase todos os adenocarcinomas, independente do local de origem, bem como por alguns carcinomas epidermóides¹³⁵. Apesar disto os níveis séricos de CEA podem ter valor prognóstico pré-operatório quando superior a 5ng/dl, e serem úteis para *follow-up* em doentes com doença metastática¹³⁶.

O diagnóstico de CRC implica um completo estadiamento da doença. A avaliação clínica deverá contemplar a presença ou ausência de ascite, organomegalias e tumores síncronos. Alterações na enzimologia hepática poderão indicar lesões secundárias, mas não são sensíveis como preditores de metástases. O estudo imagiológico é mandatório, com recurso a ecografia, CT toraco-abdomino-pélvica, ressonância magnética e tomografia de emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) e permitirá a avaliação de doença secundária, maioritariamente metástases pulmonares e hepáticas^{134,137-139}. Este estudo permitirá a distinção entre um CRC inicial e localizado e um CRC avançado, abordados em detalhe mais à frente nesta dissertação, e culmina com um estadiamento da doença de acordo com o preconizado pela “*American Joint Cancer Committee / Union for International Cancer Control tumor-node-metastases (TNM) classification*”, 8^a edição, de acordo com a figura 5.

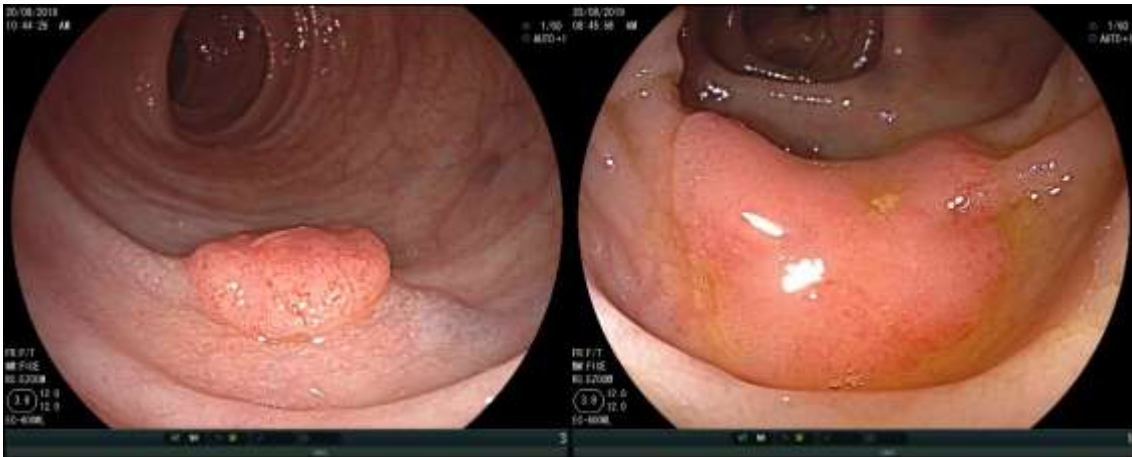


Figura 6. Lesão polipoide de superfície escavada e focalmente com vasos anómalos de aspeto endoscópico suspeito (lado esquerdo). Lesão plana e ligeiramente granular, com extensão lateral, de superfície ligeiramente irregular, embora não muito suspeita (lado direita). O estudo histológico de ambas as lesões polipoides revelou adenocarcinoma precoce invasor (T1). Imagens endoscópicas cedidas cordialmente pelo Dr. Pedro Amaro.

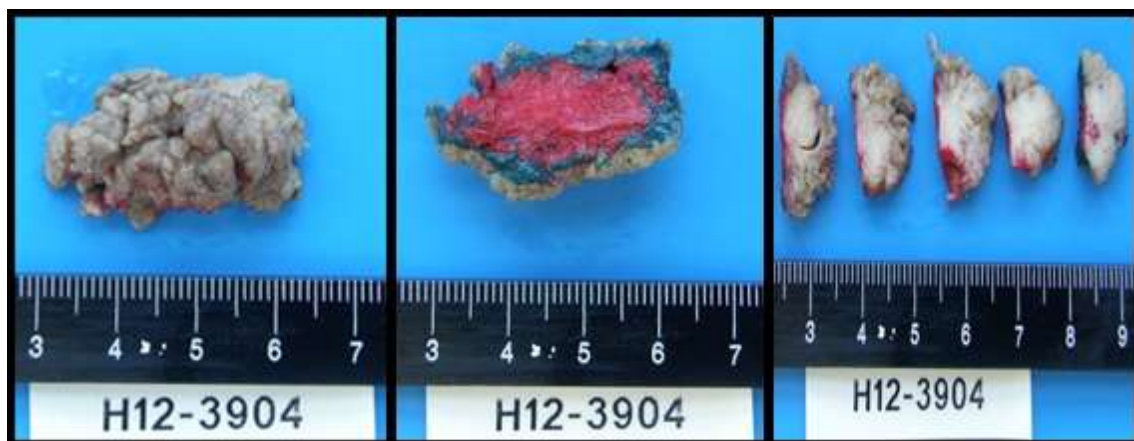


Figura 9. Mucosectomia cólica após fixação (lado esquerdo); as margens cirúrgicas são devidamente identificadas com tinta-da-china (ao meio); posteriormente são efetuados cortes com cerca de 3 mm de espessura com inclusão total para observação microscópica – em secção o tecido é branco e firme, com extensão em profundidade e suspeito para carcinoma invasor (lado direito). O estudo histológico posterior revelou um adenocarcinoma invasor da submucosa (T1).

O estudo patológico é fundamental nestas circunstâncias pois permitirá avaliar a ressecção completa da lesão, ao nível da margem circunferencial e da margem profunda, e a aferição de fatores de pior prognóstico, identificando doentes que necessitam de posterior ressecção cirúrgica¹⁴¹.

A distância às margens cirúrgicas é extremamente importante pois permite avaliar se ocorreu ressecção completa da lesão. Esta avaliação tem início no estudo macroscópico, com pintura da superfície de ressecção e cortes corretos. No caso de lesões removidas de forma fragmentada a margem não pode ser avaliada de forma fidedigna¹⁴¹. No entanto mesmo em lesões completamente removidas há lesões que exibem metástases ganglionares linfáticas. Vários estudos abordaram estas ocorrências,

identificando características predisponentes. No estudo anatomo-patológico destas lesões, a primeira abordagem é aferir o grau de displasia e avaliar se há invasão da submucosa, sendo este último critério o que define o carcinoma invasor. Compromisso da lâmina própria pode ser exuberante em algumas lesões, mas sem infiltração para lá da muscular da mucosa não é classificado como adenocarcinoma invasor⁴⁹. Em alguns casos a infiltração da submucosa pode ser focal, com necessidade de utilização de técnicas complementares, conforme exemplificado na figura 8.

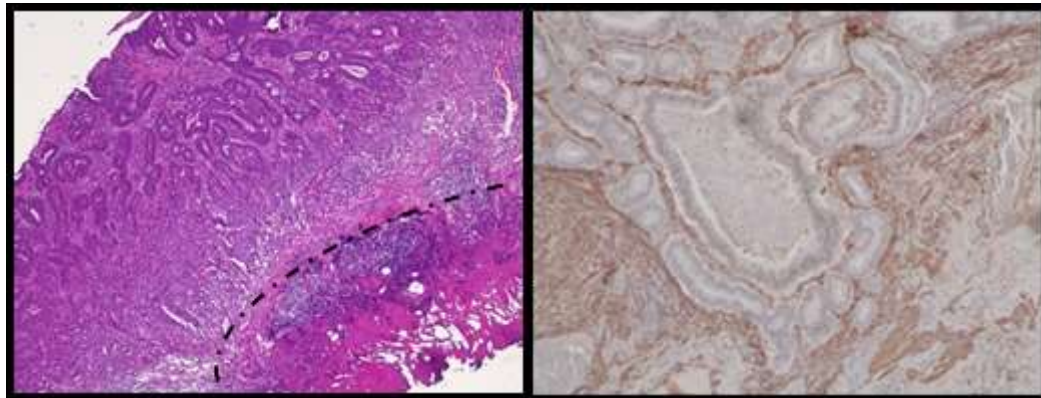


Figura 8. Adenoma com displasia de alto grau e extenso compromisso da *lâmina propria* e denso infiltrado inflamatório, mas sem invasão da *muscularis mucosa* (linha pontuada) (esquerda); imunomarcção para actina do músculo liso demonstrando invasão focal da *muscularis mucosa* por um adenocarcinoma – pT1 (direita).

Assim que o diagnóstico de adenocarcinoma invasor está estabelecido existem diversos parâmetros que precisam de serem avaliados. O grau de diferenciação tumoral representa um fator de risco independente para envolvimento ganglionar. A atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica o CRC em baixo e alto grau⁴⁹, baseando-se na percentagem de formação de glândulas, sendo que os tumores cujos elementos glandulares constituam menos de 50% do seu volume são classificados com alto grau.

A invasão linfovascular, como é possível observar na figura 9, é um fator de risco bem conhecido e com associação à presença de metástases linfáticas¹⁴². Esta pode ocorrer em veias ou linfáticos, não sendo necessariamente importante essa distinção quando ocorre em vasos de pequenas dimensões, sem túnica elástica ou muscular evidente¹⁴¹. A invasão de grandes vasos é definida por tumor em espaços vasculares com lâmina elástica ou túnica muscular envolvente¹⁴¹ e deverá ser registada separadamente da invasão de pequenos vasos.

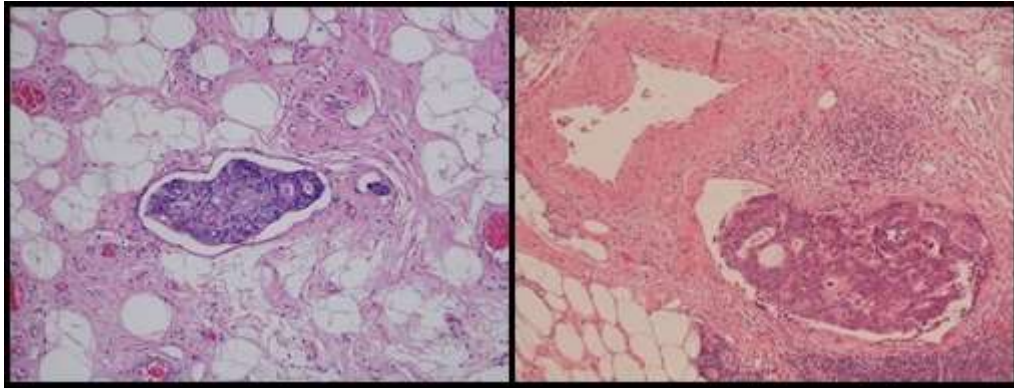


Figura 9. Embolização linfovascular de pequeno vaso observam-se células neoplásicas num espaço óticamente vazio, revestido por endotélio (esquerda); embolização vascular de um vaso de calibre considerável com fibras musculares à periferia (direita).

A invasão neural, que se observa na figura 10, é igualmente um fator de pior prognóstico em CRC iniciais e avançados, estando associada a pior sobrevivência global e não necessariamente a invasão linfovascular^{143,144}. O processo de invasão perineural representa uma possível via metastática para disseminação tumoral e deverá ser considerada uma característica de alto grau de malignidade, com impacto na sobrevivência sobreponível à profundidade de invasão, invasão linfovascular e grau de diferenciação¹⁴⁵.

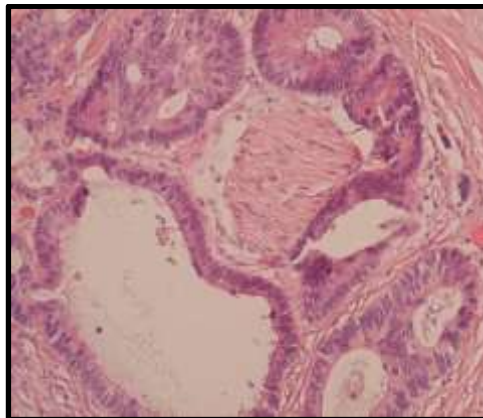


Figura 10. Representação de invasão perineural. Observa-se uma distribuição concêntrica das glândulas tumorais em torno de um filete nervoso, com contacto com a parede do mesmo.

A profundidade de invasão da submucosa foi igualmente descrita como um fator com influência na invasão ganglionar. Vários autores descreveram este fenómeno, sendo os estudos mais bem-sucedidos os de Kikuchi¹⁴⁶ e Haggit¹⁴⁷. Kikuchi propôs uma classificação para lesões sésseis, em que sm1 representava uma invasão do terço superior da submucosa, sm2 uma invasão do terço médio e sm3 uma invasão do terço inferior, com risco acrescido de metástases ganglionares quanto maior a profundidade de invasão¹⁴⁶. Já a classificação de Haggit aplica-se às lesões pediculadas, sendo definido um nível 1 para invasão da cabeça do pólip, nível 2 para invasão do porção superior do pedículo do pólip, nível 3 para invasão do eixo do pedículo do pólip e nível 4 a

representar uma infiltração da submucosa abaixo do pedículo, com aumento progressivo do risco de invasão ganglionar¹⁴⁷.

Estas classificações são reprodutíveis, e por norma, fáceis de aplicar, contudo normalmente a muscular própria não está presente para se dividir de forma eficaz a submucosa. Nessas situações é recomendada a medição absoluta da invasão do tumor – ora desde a muscular da mucosa (se intacta), ora desde a superfície do pólipó (se a muscular da mucosa está obliterada) até à zona de maior invasão da submucosa. Em casos de invasão da submucosa superior a 1 mm, está associado um aumento do risco de metastização ganglionar¹⁴⁸.

Nos últimos anos têm vindo a ganhar relevância o conceito de *tumor budding*, que corresponde a células tumorais isoladas ou agregados com menos de cinco células tumorais, localizadas na frente invasora^{117,149,150}. Esta característica tumoral reflete um comportamento biológico distinto, não devendo ser confundida com crescimento expansivo ou infiltrativo, e representa uma interação valiosa do tumor com o microambiente¹⁵¹. Os *buds* tumorais estão associados à transição epitélio-mesênquima, o que resulta numa capacidade de migração, invasão e resistência à apoptose superior às restantes células tumorais^{152,153} e conseqüentemente maior risco de metástases ganglionares linfáticas¹⁵⁴. O valor do *tumor budding* na decisão clínica de doentes com CRC precoce está bem instituído, com o desenvolvimento de consenso específico e está integrado no relatório diário do patologista¹⁵⁵.

Paralelamente com a introdução de *tumor budding*, ocorreu o estudo de *clusters* pouco diferenciados (*poorly differentiated clusters* – PDC). Os PDC correspondem a agrupamentos com mais de cinco células tumorais, que exibem perda da diferenciação glandular, localizados na frente invasora do tumor, por vezes associados a *tumor budding*, tal como demonstrado na figura 11¹⁵⁶. Do ponto de vista biológico e molecular os PDC partilham características com *tumor budding*, registando-se perda da expressão de E-caderina e expressão nuclear da proteína beta-catenina, traduzindo transição epitélio-mesênquima¹⁵⁷, estando por isso associados a risco aumentado de invasão linfovascular e perineural, metástases ganglionares linfáticas e, conseqüentemente, pior prognóstico¹⁵⁸. Um sistema de graduação em três categorias tem sido proposto – Grau 1 (menos de cinco PDC; Grau 2 – cinco a nove PDC; Grau 3 – mais de dez PDC)^{158,159}, no entanto, ainda não está integrado na prática clínica.

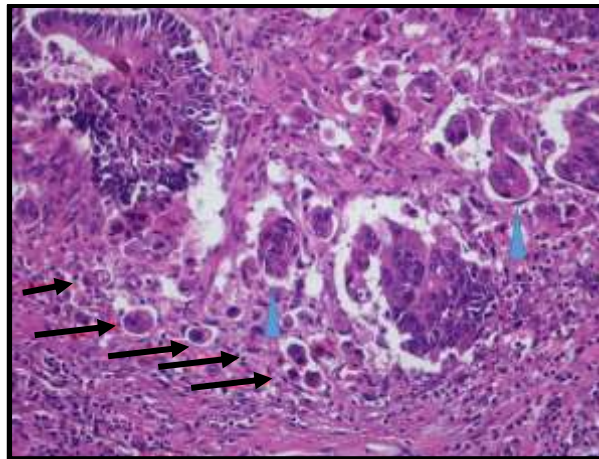


Figura 11. Representação histológica de *tumor budding* (setas pretas) e *clusters* pouco diferenciados (ponta de seta azul) localizados na frente invasora de um adenocarcinoma colorretal.

5.3 CRC avançado

Um CRC avançado corresponde a uma neoplasia que já venceu as barreiras iniciais do organismo e apresenta doença metastática, ora sob a forma de metástases ganglionares linfáticas, exemplificada na figura 12, ora sob a forma de metástases distantes peritoneais, hepáticas, pulmonares, entre outras localizações. Este evento é relativamente frequente no CRC. Cerca de 25% dos doentes apresentam-se com metástases aquando do diagnóstico e cerca de 50-60% dos doentes desenvolverão metástases, contribuindo para a elevada mortalidade desta doença^{160,161}.

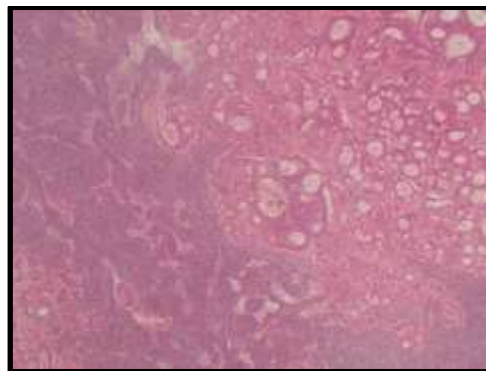


Figura 12. Metástase ganglionar linfática de carcinoma colorretal.

Nesta circunstância os doentes já não deverão submetidos apenas a técnicas cirúrgicas, mas também necessitarão de tratamento adjuvante e/ou neoadjuvante¹⁶⁰, por forma a limitar a progressão da doença e melhor a sobrevivência, especialmente na dosagem e *tempo* adequados^{162,163}, decididos em reunião de decisão terapêutica multidisciplinar¹⁶⁴. Os agentes quimioterápicos mais utilizados são a fluoropirimidina, o 5-fluoracilo, o irinotecano, a capecitabina e a leucovorina, isolados ou em combinação. A combinação FOLFOX inclui o 5-fluoracilo, leucovorina e oxaliplatina, a combinação FOLFIRI inclui o 5-fluoracilo, a leucovorina e o irinotecano¹⁶⁰. No entanto a sua eficácia nem sempre é a ideal e exibem efeitos tóxicos por vezes importantes tais como esteatose hepática e síndrome de obstrução sinusoidal, que aumentam os riscos de

resseção hepática^{165,166}. Nesse sentido, biomarcadores que possam selecionar uma terapêutica específica serão extremamente valiosos.

A avaliação histológica de rotina apresenta igualmente valor prognóstico na avaliação do CRC avançado. A classificação TNM tem um valor prognóstico, com piores sobrevivências em doentes em estádios mais avançados de doença⁴⁹, mas para doentes no mesmo estágio tumoral outros fatores revelam influência na progressão tumoral. Dos subtipos histológicos referidos na classificação de 2019 da OMS⁴⁹, existem subtipos com significado prognóstico distinto¹⁶⁷: O carcinoma de células pouco coesas em anel de sinete, como representado na figura 13A, tem sido aquele que apresenta o pior prognóstico¹⁶⁸, com resultados algo divergentes no que diz respeito ao adenocarcinoma mucinoso¹⁶⁹, figura 13B. O adenocarcinoma serreado tem sido descrito como uma variante com pior prognóstico, figura 13C, mesmo em fases iniciais, quando comparado com o adenocarcinoma convencional¹⁷⁰. Outros subtipos incluem o carcinoma medular, que pela sua associação com infiltrado inflamatório denso e rico em linfócitos tem sido descrito como provável respondedor a terapias imunes¹⁷¹, no entanto em algumas coortes apresenta maior agressividade que o adenocarcinoma convencional¹⁷²; o adenocarcinoma micropapilar, associado a alto risco de invasão linfovascular¹⁷³, e o carcinoma sarcomatoide e indiferenciado^{167,174}, figura 13D.

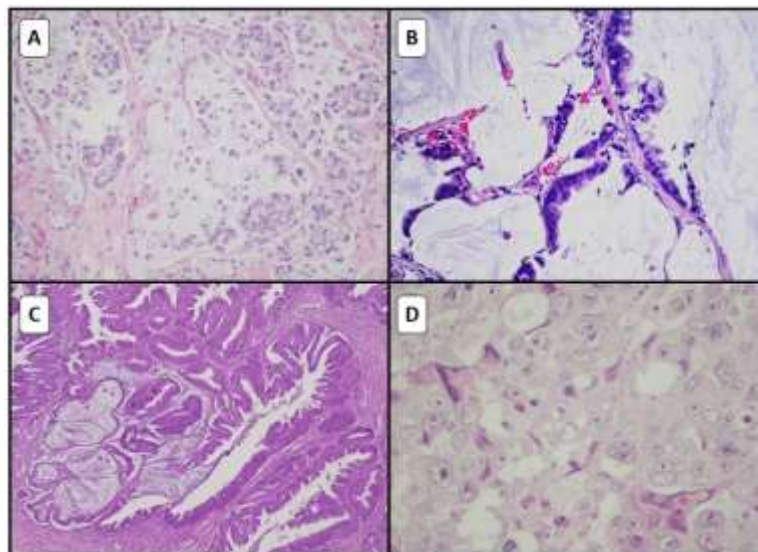


Figura 13. Variantes histológicas do carcinoma colorretal: A – carcinoma de células pouco coesas em anel de sinete; B – adenocarcinoma mucinoso; C – adenocarcinoma serreado; D- carcinoma indiferenciado.

O grau de diferenciação, invasão linfovascular e perineural está igualmente associado a sobrevivência global, com piores resultados em doentes que apresentem pior diferenciação e invasão linfovascular e perineural⁴⁹. No que diz respeito à doença metastática ganglionar, esta apresenta associação com pior sobrevivência em estados mais avançados¹⁷⁵, e há estudos que apontam como fator de prognóstico a razão entre

o número de gânglios linfáticos metastizados e o número de gânglios linfáticos isolados, e não apenas a contagem absoluta do número de gânglios com doença metastática^{176,177}.

Um achado interessante e associado com melhor prognóstico é a presença de linfócitos intratumorais e reação inflamatória *Crohn-like*⁴⁹. Esta associação entre maior densidade inflamatória intratumoral e melhor sobrevivência foi descrita de forma consistente pela primeira vez em 1986 por JR Jass¹⁷⁸. Nos últimos anos, diversos estudos corroboraram esta associação favorável, com base na avaliação do infiltrado inflamatório¹⁷⁹⁻¹⁸¹, por vezes com recurso a *software* de análise complexo¹⁸². Várias populações inflamatórias têm vindo a ser associadas a melhor prognóstico no CRC, nomeadamente os eosinófilos^{183,184}, os macrófagos de tipo M1¹⁸⁵⁻¹⁸⁷, as células T citotóxicas, em particular as células com expressão de Foxp3^{188,189}, e as células dendríticas¹⁹⁰.

O tema de inflamação e CRC, com conseqüente melhor prognóstico em situação de inflamação mais intensa, foi abordado por Klintrup *et al*¹⁹¹, que concluíram que praticamente todas as subpopulações imunes contribuem para um melhor prognóstico do CRC, e que a dicotomização do infiltrado inflamatório em baixo e alto grau, denominado por score de Klintrup-Mäkinen, tem reprodutibilidade e valor prognóstico.

Todos estes achados estão na base da imunoterapia, conceito que tem vindo a ganhar espaço e notoriedade no tratamento do CRC, em particular com a terapêutica baseada em células dendríticas^{192,193} bem como terapias com inibidores de *checkpoints* imunes¹⁹⁴. A densidade do infiltrado inflamatório assume importância acrescida permitindo a classificação dos tumores em “quentes”, com denso infiltrado inflamatório, e “frios”, com infiltrado inflamatório ligeiro, com previsão de resposta à terapêutica¹⁹⁵. Este conceito é de tal forma importante, que a conversão de tumores “frios” em “quentes” tem sido descrita como uma ferramenta adicional para o tratamento de várias neoplasias sólidas, incluindo o CRC, de acordo com a figura 14¹⁹⁶.

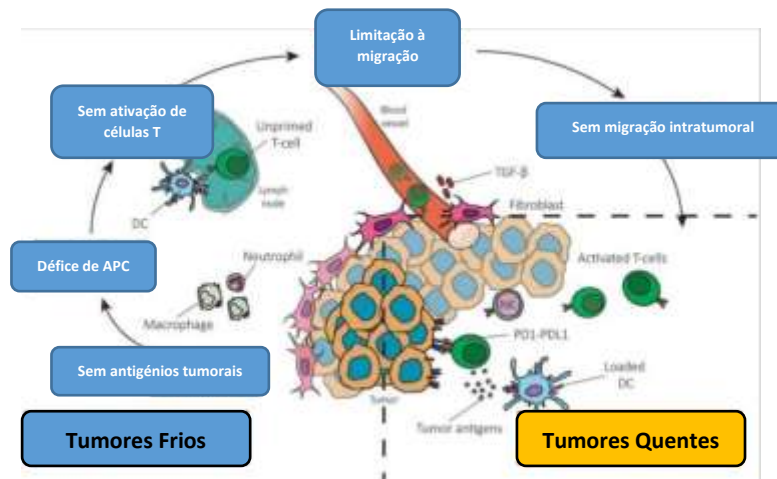


Figura 14. Transformação de um tumor “frio” em um tumor “quente”. A ausência de células T no seio tumoral pode ser devido à ausência de antígenos tumorais, déficit de APC – *antigen presenting cells*, ausência de ativação de células T ou limitação à migração das células T para o seio do tumor. O conhecimento do mecanismo pelo qual a atividade antitumoral não se encontra funcional é crucial para adaptar terapias e transformar estas neoplasias em tumores “quentes” – adaptado de Bonaventura P et al. (2019) Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol.* 10: 168.

No entanto, apesar de todos os indicadores de prognóstico conferidos pela avaliação histológica, esta não providencia alvos biológicos para terapêutica dirigida. Nesse sentido vários biomarcadores moleculares devem ser caracterizados por forma a tratar efetivamente o CRC.

A ativação aberrante da via de sinalização do EGFR (do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*) é um mecanismo bastante comum na carcinogênese do CRC e as mutações dos genes *KRAS* (do inglês, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *NRAS* (do inglês, *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*) e *BRAF* estão descritas em mais de 50% dos casos¹⁹⁷. Anticorpos monoclonais como o cetuximab ou panitumab ligam-se ao domínio extracelular do EGFR, bloqueando ligandos endógenos e consequentemente a via de sinalização. No entanto, em doentes com mutações do gene *RAS* observa-se uma ativação constitucional da via de sinalização MAPK, observável na figura 15, o que induz uma resistência aos anticorpos referidos¹⁹⁸. Assim, doentes com CRC avançado deverão ser testados para mutações do gene *RAS* de forma sistemática, com incidência nos codões 12 e 13 do exão 2, nos codões 59 e 61 do exão 3, e nos codões 117 e 146 do exão 4¹⁹⁷. Pelo exposto, o tratamento com anticorpos anti-EGFR deverá ser reservado para CRC *RAS wild-type*, não apenas para *KRAS wild-type*, seja na forma isolada ou em combinação com quimioterapia; o tratamento com anticorpos anti-EGFR pode até ser prejudicial em doentes com mutações *RAS*^{160,199}.

O gene *BRAF* é igualmente importante na via MAPK e representa uma mutação frequente num conjunto substancial de doentes com CRC, entre 8 e 12%, especialmente a sua mutação V600E que contempla a substituição de valina por glutamato na posição 600¹⁹⁸. Os doentes com CRC e mutação *BRAF V600E* exibem um perfil clínico e

patológico distinto, visto que incluem doentes em idades mais avançadas e associação com género feminino, localização no cólon direito e maior risco de metástases linfáticas e peritoneais^{200–203}. Os doentes com mutação *BRAF V600E* apresentam muito mau prognóstico²⁰⁴.

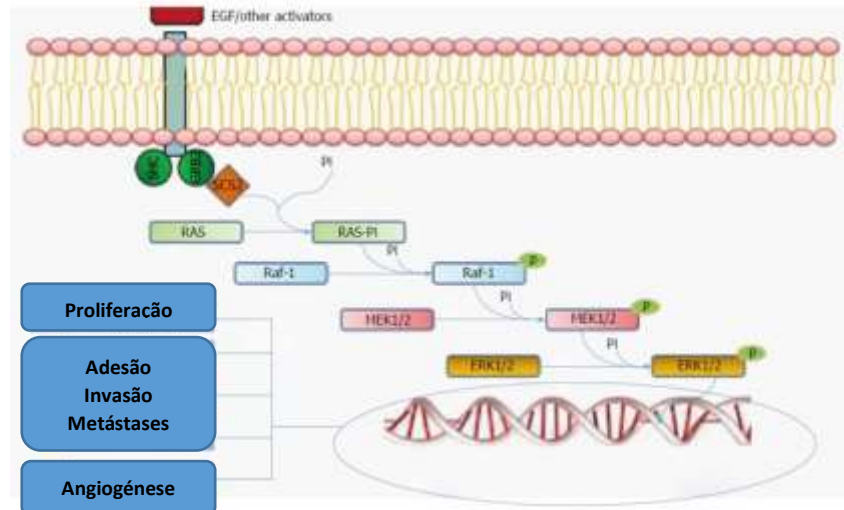


Figura 15. Via MAPK – a ativação do EGFR leva a um conjunto de efeitos em cascada, com ativação *RAS/Raf-1/MEK/ERK* e consequente transcrição genética com estímulo da proliferação, invasão tecidual e angiogénese. Mutações *RAS* levam a uma ativação constitucional desta via, sem necessidade do estímulo do EGFR, ou seja, não beneficiando da terapia com anti-EGFR – adaptado de Mucia O *et al.* (2016) Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J Gastroenterol* 22(13): 3516–3530.

A mutação *BRAF V600E* deverá ser detetada por métodos de sequenciação, no entanto, uma marcação imuno-histoquímica tal como representado na figura 16, poderá ser efetuada como forma de rastreio mutacional com elevada sensibilidade e especificidade²⁰⁵.

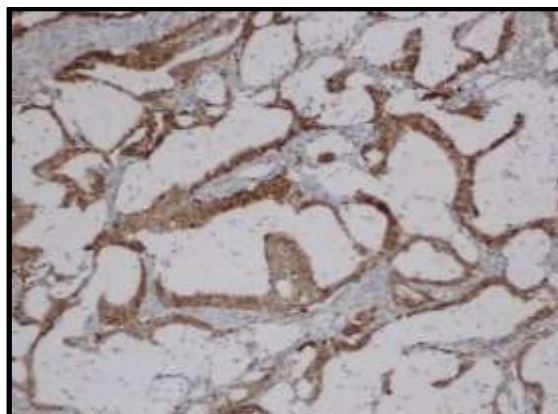


Figura 16. Marcação imuno-histoquímica para *BRAF V600E*, com expressão citoplasmática forte e difusa.

Atendendo ao pobre prognóstico de doentes com CRC e mutação *BRAF V600E*, várias terapêuticas personalizadas têm sido alvo de desenvolvimento. Uma abordagem promissora envolveu a aplicação de dois inibidores *BRAF* utilizados com sucesso no

melanoma, vemurafenib e dabrafenib; no entanto no CRC não se observa a mesma eficácia terapêutica, muito devido a marcadas diferenças biológicas, já que as células de melanoma não são epiteliais e não expressam EGFR. A reativação da sinalização EGFR tem sido apontada como responsável pela fraca resposta terapêutica^{200,206}. Terapêutica combinada com quimioterapia tripla, bevacizumab e vemurafenib poderá demonstrar eficácia aumentada em doentes com mutação *BRAF V600E*^{200,207}.

Nos últimos anos e com uma maior utilização de ferramentas de sequenciação, têm sido identificados doentes com mutações *BRAF* fora do codão 600, denominadas de mutações não *V600E*. Estes doentes apresentam melhor prognóstico e resposta à terapêutica, com maior sobrevivência quando comparados com doentes *BRAF wild-type*^{208,209}.

A instabilidade de microssatélites (MSI) tem adquirido nos últimos anos um papel no que diz respeito a decisão terapêutica, para além do seu valor na identificação de situações hereditárias de CRC. A presença de MSI está associada a melhor prognóstico no CRC^{210,211}. Estes tumores são muito imunogénicos e como tal respondem a terapias que estimulam o sistema imune, mas também porque como apresentam um sistema de reparação de erros de DNA com defeitos, implica que as células tumorais são destruídas de forma mais eficaz pela quimioterapia^{212,213}.

Nos casos de sobreposição entre CRC com mutação *BRAF V600E* e MSI esporádica, os resultados são ainda contraditórios no que dizem respeito à sobrevivência geral²⁰⁰, no entanto a elevada resposta imune induzida por estes tumores abre possibilidades de terapia com inibidores dos *checkpoints* imunitários²¹⁴.

De acordo com as últimas *guidelines* estabelecidas¹⁶⁰ todos os doentes com CRC deveriam ser testados para MSI por métodos de imuno-histoquímica, embora por razões economicistas se recomende o teste em todos os doentes com idade inferior a 70 anos, ou idade superior a 70 anos e que cumpram os critérios de Bethesda. Esta avaliação deverá ser efetuada independente do estágio do tumor¹⁶⁰. A avaliação da marcação é efetuada de acordo com os critérios estabelecidos e já descritos previamente para a SL.

Atendo que as mutações *RAS* são relativamente frequentes em CRC e que estes doentes não beneficiam de tratamento com anti-EGFR²¹⁵, outros biomarcadores têm surgido, especialmente em contexto de mutações *RAS*, passíveis de determinação por imuno-histoquímica. A amplificação do gene *HER-2*, associada a sobre-expressão, induz a sua ativação através da dimerização com os outros parceiros da mesma família, EGFR, *HER-3* e *HER-4*²¹⁶. No CRC a amplificação de *HER-2* é algo variável, mas representa uma quantidade importante de doentes numa percentagem de cerca pode ir até 11%²¹⁷. A avaliação da sobre-expressão de *HER-2* no CRC é efetuada de forma análoga à avaliação no carcinoma gástrico: score 0 para ausência de marcação; score 1+ quando a marcação é ténue e quase impercetível em mais de 10% das células tumorais; score 2+ quando a

marcação é basolateral/lateral/circunferencial, de intensidade fraca a moderada em mais de 10% das células tumorais; e score 3+ quando a marcação é basolateral/lateral/circunferencial, de intensidade forte, em mais de 10% das células tumorais, com confirmação por hibridização *in situ* para os scores 2+ e 3+^{216,218}. A sobre-expressão de *HER-2* em doentes com CRC abre uma janela terapêutica muito útil, especialmente em doentes metastáticos, com transtuzumab, isolado ou em combinação com outros agentes^{219,220}.

A determinação imuno-histoquímica da sobre-expressão do EGFR, tal como exemplificado na figura 17, tem também vindo a ser descrita na literatura em doentes com expressão de *RAS wild type*, visto que nem todos os doentes respondem da mesma forma à terapia com anti-EGFR²²¹. A categorização da marcação é efetuada em ausente, ou seja score 0, e membranar em mais de 10% das células neoplásicas; se fraca, score 1+, se moderada, score 2+, e se forte score 3+²²². No entanto há casos sem sobre-expressão de EGFR que respondem aos anti-EGFR, pelo que a ausência de marcação poderá limitar o acesso à terapêutica a um subgrupo de doentes com CRC²²².



Figura 17. Marcação imuno-histoquímica para EGFR, com marcação membranar forte em mais de 10% das células neoplásicas – score 3+.

Novos biomarcadores de prognóstico e terapêutica têm emergido, nomeadamente no que diz respeito a mutações *PTEN* (do inglês, *phosphatase and tensin homolog*) e *TP53* e múltiplos mRNAs, no entanto ainda estão em fase de validação²²³. A recente aprovação do larotrectinib veio transformar a terapêutica dos tumores com fusões do gene *NTRK* (do inglês, *Neurotrophic tropomyosin receptor kinase*) que compreende 3 genes: *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*, num alvo atrativo e com elevadas taxas de resposta^{224,225}. A deteção de fusões *NTRK* poderá ser realizada numa primeira fase com marcação imuno-histoquímica com anticorpo anti-panNTRK e posteriormente confirmada com técnicas de FISH ou de NGS²²⁶. Embora as mutações *NTRK* ocorram apenas numa pequena percentagem de CRC, a possibilidade de deteção das mesmas e abordagem com terapia específica deverá ser considerada^{227,228}.

Uma área em recente expansão por força da terapia personalizada é a imunidade anti-tumoral²²⁹. Estudos com inibidores dos checkpoints do sistema imunitário, em concreto os dirigidos contra o antigénio 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e contra o recetor de morte programada (PD-1) e o seu ligando PD-L1 têm revelado resultados muito promissores no contexto de CRC metastático^{214,230}. A possibilidade de aplicação destas terapias poderá ser determinada pela expressão imuno-histoquímica de PD-L1 nas células tumorais^{231,232}, no entanto questões sobre qual o melhor clone a utilizar e quais os critérios para definir positividade ainda são algo subjetivos.

Nesse sentido, a evidência de defeitos de reparação no DNA por intermédio de MSI, parece ser um excelente indicador de resposta à terapia imune, visto que neste tipo de CRC existe uma grande carga mutacional com consequente aumento da eficácia da imunoterapia²³³. Os CRC com instabilidade de microssatélites apresentam normalmente um denso infiltrado inflamatório linfocítico e um microambiente rico em citocinas, associado à sobre-expressão de proteínas associadas aos checkpoints do sistema imunitário^{234,235}. No entanto, os CRC com MSI representam apenas um subgrupo de doentes e nem todos respondem à imunoterapia²³⁶. Assim, uma compreensão do sistema imune é essencial para otimizar a imunoterapia e o conceito recente de *tumour mutational burden* (TMB) que veio introduzir mais uma variável na equação, baseando-se no conceito de que os tumores com TMB elevado apresentam múltiplos neoantígenos, passíveis de ser alvo pelo sistema imune, sendo este achado por vezes independente de MSI e da expressão de PD-L1^{237,238}.

Será ainda de realçar o papel da biópsia líquida no CRC. O conceito de biópsia líquida baseia-se na deteção de células tumorais ou DNA tumoral circulante, com posterior análise de mutações e carga tumoral, permitindo assim prever a recidiva tumoral precoce num contexto pré-clínico e imagiológico e detetar mutações que possam conferir resistência à terapêutica²³⁹. Esta análise tem elevada concordância com o tecido e está indicada em estágio IV, quando não é possível obter amostra tecidual²⁴⁰. Apresenta como desvantagens a necessidade de necessitar de uma determinada quantidade de DNA tumoral, presente apenas em estádios mais avançados de doença e apenas representar mutações tumorais e não o microambiente necessário para técnicas de imunoterapia²⁴¹. A sua grande aplicação será porventura a deteção precoce de mutações *KRAS* em doentes *RAS wild type*²⁴².

Todos estes elementos traduzem o facto de que o CRC é uma neoplasia heterogénea, com uma multiplicidade de vias de sinalização celulares ativadas e implicadas na carcinogénese²⁴³, por vezes na mesma neoplasia e com diferenças entre o tumor primário e a metástase, traduzindo a heterogeneidade espacial e temporal^{244,245}. Recentemente foi publicada a classificação molecular do CRC²⁴⁶, explanada na Tabela 1, que define uma classificação taxonómica em 4 subtipos de acordo com as vias moleculares alteradas, características morfológicas e prognóstico. O subtipo molecular 1 refere-se à instabilidade de microssatélites/imune, o subtipo

molecular 2 – canônico; subtipo molecular 3 – metabólico; subtipo molecular 4 – mesenquimal.

Tabela 1. Classificação molecular do carcinoma colorretal em 4 subgrupos, com respectivas frequências, alterações genéticas e mutações mais comuns, diferentes perfis imunes e metabólicos, correlação clínico-patológica e prognóstico. Adaptado de Guinney J *et al.* (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 21(11):1350-6.

MSI – instabilidade de microssatélites; MSS – estabilidade de microssatélites; CIMP – fenótipo metilador das ilhas CpG; SCNA – análises de número de cópias somáticas.

Subtipo molecular	#1 Instabilidade de microssatélites/imune	#2 Canônico	#3 Metabólico	#4 Mesenquimal
Frequência	14%	37%	13%	23%
Alterações genéticas	MSI, alto CIMP, hipermutação	Alta SCNA	Status misto MSI/MSS, baixa SCNA, baixo CIMP	Elevada SCNA
Mutações comuns	BRAF	_____	KRAS	_____
Perfis imunes e metabólicos	Infiltração imune; sistema imune ativado	Ativação da via Wnt e Myc	Desregulação metabólica	Infiltração estromal; angiogênese; ativação do TGFβ
Correlação clínica e patológica	Gênero feminino; cólon direito; produção de mucina; reação inflamatória	Cólon esquerda; reto; moderadamente diferenciados (G2)	_____	_____
Prognóstico	Pior sobrevivência após recidiva	_____	_____	Pior sobrevivência global e livre de doença

6. Avaliação das metástases hepáticas

O envolvimento hepático por CRC é um evento comum, e em determinadas regiões geográficas, nomeadamente na Europa, os tumores secundários hepáticos são mais comuns que os primários²⁴⁷, com óbvio acréscimo de mortalidade²⁴⁸.

Nos últimos anos assistimos a um desenvolvimento das estratégias de tratamento das metástases hepáticas de carcinoma colorretal (CRCLM) tais como agentes de quimioterapia mais eficazes, embolização da veia porta, hepatectomias a dois tempos, incluindo a realização da abordagem *Associating Liver Partition and Portal vein Ligation for Staged hepatectomy* e ressecções cirúrgicas poupadoras de parênquima guiadas por ecografia intra-operatória, que expandiram os limites da ressecabilidade oncológica^{249,250}. Em casos selecionados o transplante hepático tem emergido com alternativa viável²⁵¹.

No entanto, apesar da intenção curativa, observa-se recorrência intra-hepática em mais de 50% dos casos, mesmo com recurso a quimioterapia adjuvante²⁵². Vários estudos retrospectivos identificaram, em coortes de doentes com metástases hepáticas, fatores de pior prognóstico tais como o tamanho da maior lesão, o número de lesões e a progressão tumoral após quimioterapia ou intervalo de tempo curto desde a ressecção do tumor primário²⁵³. Não obstante, nenhum destes fatores de risco é uma contraindicação para cirurgia hepática e não traduz a interação tumor/hospedeiro que

é fundamental para um tratamento individualizado. Cirurgias hepáticas mais agressivas não se traduzem em sobrevivência aumentada²⁵⁴ e quimioterapia neoadjuvante está associada a um aumento importante da mobilidade pós-operatória¹⁶⁵.

Nos últimos anos, o padrão de crescimento (PC) histológico das CRCLM tem sido identificado como fator de prognóstico prático e reprodutível, avaliável numa lâmina corada com Hematoxilina e Eosina. O padrão de crescimento é definido como expansivo – quando o tumor comprime os hepatócitos adjacentes; desmoplásico quando existe a presença de uma banda de tecido fibroso na periferia do tumor; e infiltrativo quando o tumor infiltra as trabéculas de hepatócitos, substituindo as células não tumorais e sem disrupção da arquitetura²⁵⁵, de acordo com o exemplificado na figura 18.

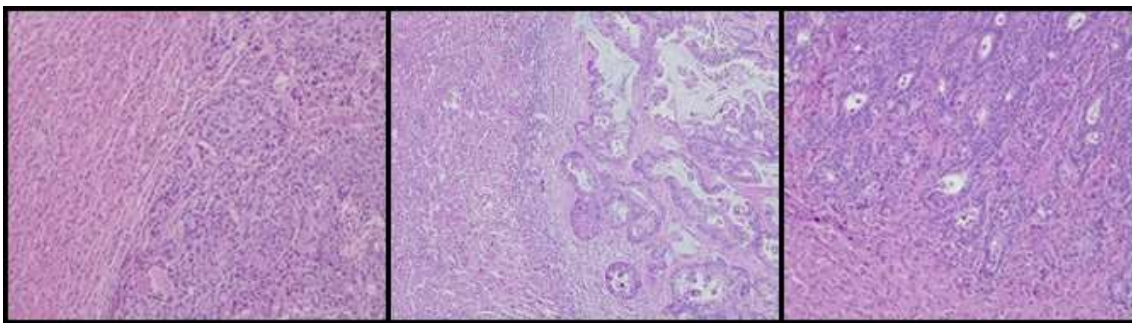


Figura 18. Três padrões de crescimento das metástases hepáticas de carcinoma colorretal: à esquerda o tipo expansivo com compressão das trabéculas de hepatócitos adjacentes; ao centro o tipo desmoplásico com uma banda fibrosa e com linfócitos entre o tumor e o parênquima hepático; à direita o padrão infiltrativo, com o tumor a crescer e a substituir os hepatócitos nas trabéculas.

Estes PC estão associados a prognósticos distintos, com um PC expansivo relacionado com pior prognóstico²⁵⁵. O que é interessante acerca deste fator de prognóstico, é que esta informação é obtida em avaliação de rotina, sem necessidade de estudos auxiliares complexos e morosos, tornando-se uma ferramenta atrativa em locais de baixos recursos.

A análise correta e classificação adequada do PC das CRCLM implica um estudo macroscópico cuidado, com uma amostragem alargada, com pelo menos um fragmento por cm de lesão, para todas as lesões^{256,257}, eventualmente com inclusão total preconizada para lesões com tamanho inferior a 3 cm, o que constitui a prática no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

A explicação destes três tipos de PC ainda não se encontra bem definida, no entanto julga-se que representa a complexidade das interações tumor/hospedeiro, sendo que alguns autores definem o padrão expansivo como mais angiogénico²⁵⁸ e o desmoplásico como representativo de uma reação inflamatória do hospedeiro ou relacionado com resposta à quimioterapia²⁵⁹.

A banda espessa presente no PC desmoplásico, enriquecida com colagénio, poderá funcionar como uma barreira à expansão tumoral e a presença de linfócitos indicar uma resposta do hospedeiro, reduzindo a infiltração do parênquima não tumoral e conseqüentemente, ser uma característica de melhor prognóstico^{255,260}. O padrão expansivo exibe um nível elevado de proliferação endotelial e sobre-expressão de fatores vasculares tais como o fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF) e o fator de crescimento endotelial vascular, por vezes de forma análoga ao CRC primário^{259,261,262}. O padrão expansivo é ainda caracterizado por um ambiente hipóxico, fator bem conhecido de agressividade e resistência à terapia^{263,264}.

A informação obtida da análise destes mecanismos moleculares que traduzem uma complexa interação tumor/hospedeiro, associada a distintos PC, poderão auxiliar na seleção de novos alvos terapêuticos. O bloqueio dos recetores de crescimento, com anticorpos anti-EGFR, e o uso de agentes anti-angiogénicos e anticorpos anti-VEGF (do inglês, *vascular endothelial growth factor*), têm demonstrado excelentes resultados no tratamento da doença metastática avançada^{265,266}. Vários estudos têm correlacionado os PC com capacidade angiogénica e a recente descoberta do mecanismo de co-utilização de vasos, através do qual o tumor utiliza os vasos já existentes do hospedeiro para crescer e não mecanismos de angiogénese, poderá explicar a resistência verificada de alguns tumores a fármacos anti-angiogénicos; terapias combinadas poderão ser a abordagem ideal de acordo com o PC da metástase²⁶⁷. Ao refletirem a interação tumor/hospedeiro, o PC das CRCLM pode influenciar a sobrevivência global e a sobrevivência livre de doença²⁶⁸. A avaliação desta característica é simples e tem sido expandida a metástases de outras neoplasias tais como carcinoma da mama²⁶⁹ e melanoma uveal²⁷⁰.

Outras características têm sido descritas na literatura com interesse prognóstico tais como a espessura do tumor na interface tumor/tecido não tumoral^{271,272} e o estudo dos linfócitos intra tumorais e sua composição^{273,274}, no entanto este tipo de análise é consumidora de tempo e requer *software* especializado.

7. Avaliação de resposta à terapia

7.1 Tumor primário

O CRC é normalmente abordado e tratado por cirurgia de ressecção se detetado em estadios precoces, com indicação para terapia adjuvante se o estágio for avançado, com melhoria da sobrevivência e com recurso a agentes diferentes, de acordo com a localização do tumor primário, nomeadamente se localizado no cólon direito ou esquerdo^{275,276}. Doente com CRC no cólon direito podem beneficiar de imunoterapia ao passo que doentes com CRC no cólon esquerdo, sem mutações do gene *KRAS* podem beneficiar de tratamento com anti-EGFR²⁷⁵.

Quando o CRC está localizado no reto e em estádios T3 / T4 ou com gânglios linfáticos classificados radiologicamente como positivos, deverá ser efetuada radioterapia pré-operatória¹³⁷. Dependendo do estadiamento tumoral as opções incluem radioterapia de esquema curto com cirurgia imediata (em menos de 10 dias após a primeira fração de radioterapia), quimioradioterapia, e / ou esquemas de quimioterapia baseada em oxaliplatina, como FOLFOX. Em estágio mais precoce ressecção mucosa transanal, seguida ou não de radioterapia, poderá ser a indicação¹³⁷.

Em CRC localizado no reto, o uso de quimioterapia neoadjuvante pode induzir regressão tumoral significativa, com resposta completa em cerca de um terço dos doentes²⁷⁷. A avaliação do grau de resposta tumoral (TRG) é efetuada tendo por base diversos esquemas, de acordo com a tabela 2, variáveis ao longo do mundo, sendo que provavelmente os mais utilizados são os esquemas de Dworak e o da AJCC/Ryan modificado²⁷⁸.

Tabela 2. Esquemas de regressão tumoral. TRG – Grau de Regressão Tumoral; AJCC – *American Joint Committee on Cancer*. Adaptado de Kim SH *et al.* 2016²⁷⁸. Comentário: O Sistema de Dworak modificado avalia o tumor primário e os gânglios linfáticos como um todo, enquanto os restantes sistemas apenas avaliam o tumor primário.

Esquema TRG	Mandard	Dworak	Dworak modificado	Ryan	Ryan modificado / AJCC
Regressão completa	Ausência de células tumorais (TRG4)	Sem células tumorais residuais (TRG1)	Sem células tumorais (TRG 4)	Sem células tumorais viáveis/células isoladas/pequenos grupos de células tumorais (TRG 1)	Sem células tumorais viáveis (TRG 0: resposta completa)
Regressão quase completa	Muito poucas células tumorais (TRG3)	Raras células tumorais residuais (TRG2)	Muito poucas células tumorais (um ou dois focos microscópicos < 0,5 cm de diâmetro) (TRG 3)	_____	Células isoladas/pequenos grupos de células tumorais (TRG 1: resposta moderada)
Regressão moderada	Poucas células / grupos tumorais, com fibrose dominante (TRG2)	Predomínio de fibrose, mas com número significativo de células tumorais (TRG3)	Fibrose dominante com poucas células / grupos tumorais (TRG 2)	Carcinoma residual, com predomínio de fibrose (TRG 2)	Carcinoma residual, com predomínio de fibrose (TRG 2: resposta mínima)
Regressão mínima	Massa tumoral dominante com focos de fibrose (TRG1)	Carcinoma residual com áreas de fibrose (TRG 4)	Massa tumoral dominante (> 50%) com áreas de fibrose ou sem regressão tumoral (TRG 1)	Focos de fibrose, mas com predomínio do carcinoma, ou ausência de fibrose com extensa área tumoral (TRG 3)	Sem morte das células tumorais ou raras células destruídas (TRG 3: resposta pobre)
Sem regressão	Sem sinais de regressão (TRG0)	Sem sinais de regressão (TRG5)	_____	_____	_____

Os esquemas de resposta tumoral são bem conhecidos pelos patologistas, cirurgiões e oncologistas, e possuem uma boa taxa de reprodutibilidade permitindo uma comunicação eficaz interpares para efeitos de tratamento dos doentes. Apesar do descrito a maioria apresenta uma grande limitação visto que apenas tem em conta as alterações a nível do tumor primário. O esquema de Dworak modificado tem esta limitação em consideração e avalia as alterações a nível do tumor primário e gânglios

linfáticos e pode revelar-se um melhor preditor de sobrevivência e recorrência, no entanto revela alguma variabilidade interobservador^{278,279}.

Esta avaliação requer cuidados especiais no estudo macroscópico. O reto deve ser medido e a margem cirúrgica circunferencial/mesorretal deverá ser marcada com tinta-da-china, com fixação posterior em formaldeído durante um período de 24-48h. Subsequentemente o espécime cirúrgico é cortado em fatias com 4 a 5 mm de espessura para avaliação da localização, tamanho e profundidade de invasão do tumor, tal como demonstrado nas figuras 19 e 20. Colhem-se amostras para estudo histológico, uma amostra por centímetro de tumor, e em casos em que não há tumor visível, uma fatia completa deverá ser incluída, ou preferencialmente toda a área de interesse²⁸⁰. No estudo histológico o patologista deve avaliar sinais de regressão tumor, tais como fibrose e calcificação, e indicar uma percentagem de tumor viável, aferir invasão linfovascular e perineural, a presença de metástases ganglionares linfáticas e determinar a distância do tumor à margem cirúrgica circunferencial²⁸¹. A distância do tumor à margem cirúrgica circunferencial é de elevada importância, em doentes com e sem quimioterapia neoadjuvante, sendo identificada em múltiplos estudos como um fator major de recorrência tumoral, mas também de complicações cirúrgicas^{282,283}.

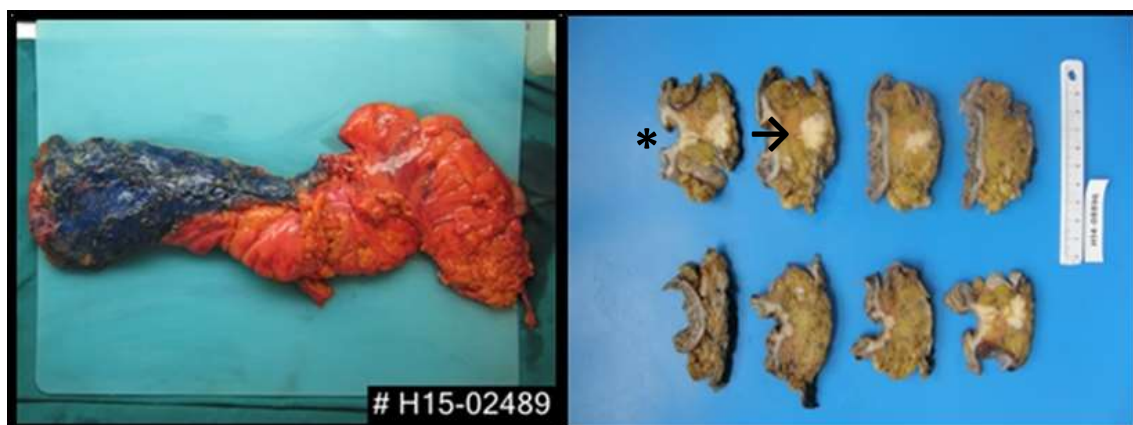


Fig. 19. Estudo macroscópico de uma ressecção anterior do reto: mesorreto intacto e globoso, devidamente marcado com tinta da China (lado esquerdo); no lado direito observam-se várias fatias de um carcinoma colorretal após terapia neoadjuvante – a nível da mucosa (*) não há tumor viável (espessamento é por fibrose) e o tumor viável está localizado a nível do tecido adiposo (→).

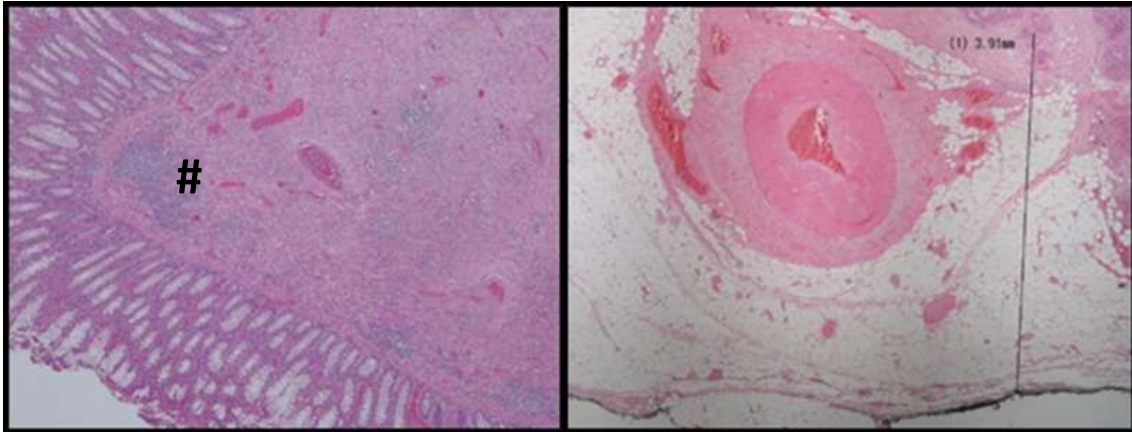


Fig. 20. No lado esquerdo é possível visualizar marcada fibrose da submucosa e infiltrado inflamatório mononuclear (#) sem tumor residual, Hematoxilina & Eosina 40x; no lado direito observa-se foco de tumor residual no tecido adiposo – a distância mínima à margem cirúrgica circunferencial é determinada com recurso a *software* específico, Hematoxilina & Eosina 40x.

7.2 Tumor secundário – metástases hepáticas

A avaliação da resposta das metástases hepáticas de CRC a terapia neoadjuvante tem por base o descrito por Rubbia-Brandt *et al.*²⁵⁶. Deverá ser efetuada uma amostragem exaustiva da lesão, eventualmente com a inclusão total por forma a aferir a resposta completa, com graduação em 5 categorias: TRG5 – sem resposta tumoral; TRG4 tumor viável em cerca de 75%; TRG3 tumor viável em cerca de 50%; TRG2 tumor viável em cerca de 25% e na periferia da lesão; TGR1 ausência de tumor viável²⁸⁴. Esta classificação encontra-se em amplo uso na esfera da anatomia patológica e tem valor prognóstico, especialmente se agrupada em categorias como ausência de resposta, resposta *minor* e resposta *major*²⁸⁵.

Pelo exposto, o CRC é uma neoplasia complexa do ponto de vista molecular e de elevada agressividade, com uma interação muito peculiar com o microambiente tumoral. A compreensão da sua interação com esse microambiente tumoral, quer a nível de tumor primário quer a nível de localizações secundárias, permitirá compreender o seu desenvolvimento e encontrar novos marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos.

Capítulo II

O modelo animal no estudo do carcinoma colorretal



1. Introdução

O CRC é um magno problema de saúde pública, com uma elevada incidência e mortalidade¹⁶, não obstante os progressos clínicos no âmbito do diagnóstico e tratamento.²⁸⁶

Atualmente é certo que o CRC é uma doença heterogênea, causada por alterações em vias patogénicas complexas e diversificadas²⁸⁷, resultando em tumores morfológicamente diferentes e com comportamentos biológicos distintos²⁴⁶. De um ponto de vista molecular, o CRC é a ponta do iceberg de um conjunto vasto e complexo de alterações genéticas²⁸⁸. Quando a este cenário se adiciona fatores tais como a influência do microambiente tumoral e o papel de *cancer stem cells* na progressão tumoral e resistência à terapêutica²⁸⁹⁻²⁹⁴ novos dados e dilemas têm de ser considerados.

Assim, o desenvolvimento e a criação de novos modelos pré-clínicos para o estudo da carcinogénese do CRC permitirão descrever de novos biomarcadores, sensíveis e específicos, para a deteção inicial de CRC. Para além disto, os modelos pré-clínicos podem contribuir para identificar doentes com maior risco de recidiva e doentes que provavelmente irão registar progressão de doença apesar da instituição de terapia adjuvante. Pelo exposto, os modelos pré-clínicos são cruciais para o tratamento do CRC.

2. A importância do modelo animal

Ao comparar o genoma humano com o genoma animal é possível entender melhor a estrutura e função de genes humanos e aplicar esse conhecimento para estudar patologias humanas e desenvolver novos mecanismos para prevenir, detetar e tratar o CRC. Neste contexto vários animais tiveram o seu genoma sequenciado, tais como o rato (*Mus musculus*), a mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*) e o mosquito portador da malária (*Anopheles gambiae*), entre outros²⁹⁵.

De todos os animais, o rato é um dos mais utilizados para o estudo da carcinogénese²⁹⁶. O seu uso como modelo para a investigação biomédica data desde há muitos séculos, quando os humanos registavam mutações na cor do pelo. Em 1700, na China e no Japão, os ratos foram domesticados como animais de estimação, e mais tarde importados para a Europa, onde foram cruzados com espécies locais, criando os progenitores dos modernos ratos de laboratórios. A aplicação das leis da transmissão hereditária de Mendel aos ratos, de forma análoga às ervilhas, deu origem a novas teorias de hereditariedade, e com recurso a tecnologias de recombinação de DNA novos modelos foram criados²⁹⁷.

Esporos e moscas revelaram-se excelentes modelos para o estudo do ciclo celular, no entanto os ratos são modelos superiores para o estudo do sistema imune, endócrino e nervoso, pois apresentam uma semelhança genética e fisiológica mais

próxima com o ser humano. Tal como o ser humano, o rato possui a capacidade de desenvolver determinadas doenças tais como cancro. Atualmente, o uso de tecnologia genética permitiu a produção de ratos transgênicos, com inserção de genes na linha germinativa, bem como alterações genéticas de tipo “*knock out*” e “*knock in*” (exemplo: *knock out* de p53 com posterior desativação do gene supressor tumoral *TP53*), que combinados com tecnologia reprodutiva de última geração providenciaram as ferramentas necessárias para um estudo profundo dos mecanismos da carcinogénese em rato²⁹⁸.

Um modelo ideal de CRC deverá permitir o desenvolvimento de tumores locais e replica todos os estádios da evolução de CRC, permitindo a avaliação da progressão da doença com recurso a métodos endoscópicos e/ou de imagem; deverá ajudar a compreender os efeitos tóxicos/adversos relacionados com a medicação e ser ajustável a laboratórios sem conhecimentos cirúrgicos, permitindo a sua replicação^{299,300}. No entanto, o desenvolvimento de modelos animais é um trabalho árduo e dependerá em grande maioria da estirpe de animal e das linhas celulares tumorais utilizadas³⁰¹.

3. Tipos de modelos animais

3.1 Modelos esporádicos de CRC/Modelos de indução química

Ao longo dos anos vários modelos de CRC têm sido desenvolvidos. De todos os modelos, provavelmente o primeiro foi aquele que demonstrou o desenvolvimento de tumores intestinais após a ingestão de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos³⁰². À data, a associação entre o desenvolvimento de CRC e a ingestão de determinados alimentos estava sob o foco de múltiplos estudos, levando à criação de modelos esporádicos de CRC. Nesse contexto vários modelos foram desenvolvidos através da administração de Ítrio radioativo³⁰³, de 4-aminodifenil e 3,2-dimetil-4-aminodifenil³⁰⁴ e 1,2-dimetilhidrazina e azoximetano³⁰⁵⁻³⁰⁷. Com o decorrer dos anos outros agentes carcinogénicos foram utilizados tais como aminas aromáticas e heterocíclicas e compostos de nitrogénios. Um agente recente e amplamente utilizado é a administração crónica de dextrano sulfato de sódio, que promove a carcinogénese de CRC ao mimetizar as condições de doença inflamatória intestinal^{308,309}.

Apesar do seu papel pioneiro no estudo da carcinogénese do CRC, estes modelos são muito limitados, pois apresentam baixo rendimento no que diz respeito ao processo de carcinogénese, ou seja apenas uma fração dos animais desenvolvem CRC, e quando se verifica exibem variabilidade na localização e diferenciação celular³¹⁰.

Por forma a ultrapassar esta limitação, uma estratégia simples foi formulada, que passava pela exposição direta dos animais a células tumorais e/ou aplicação *in situ* de elementos carcinogénicos. Esta linha de pensamento deu origem a novos modelos animais com necessidade de competências cirúrgicas e inoculação de elementos

tumorais (hidrocarbonetos aromáticos, proteínas, células tumorais, entre outros) diretamente nos animais.

3.2 Elementos carcinogênicos *in situ*

A introdução *in situ* de elementos carcinogênicos, normalmente por via intrarretal, permite anular o efeito de passagem pelo trato digestivo, eliminando alterações enzimáticas³¹¹. Este tipo de modelos apresentam uma eficácia superior aos modelos esporádicos e foram muito beneficiados pela criação de modelos genéticos. No entanto, quando os animais desenvolvem doença metastática, a maioria deles está demasiado frágil para a execução de testes terapêuticos²⁹⁹.

3.3 Modelos peritoneais

A injeção de células tumorais no peritôneu/cavidade peritoneal foi provavelmente umas das primeiras ideias de promoção do crescimento tumoral no animal. Hoje em dia ainda este tipo de modelo é utilizado, induzindo formação de nódulos tumorais peritoneais mas também disseminação tumoral pela cavidade abdominal³¹². Este tipo de modelo tem como desvantagem não replicar o comportamento biológico de CRC, sendo atualmente um modelo utilizado para tumores não sólidos tais como leucemias e para avaliação de resposta a agentes farmacológicos³¹³, visto que metástases peritoneais apresentam pior prognóstico quando comparadas com metástases de outras localizações e carecem ainda de terapêuticas válidas³¹⁴.

3.4 Xenotransplantes

Nas últimas décadas o modelo de xenotransplante foi adotado como alternativa aos métodos prévios e permitindo ultrapassar as limitações dos modelos anteriores. Células tumorais são injetadas a nível subcutâneo em modelos animais imunocomprometidos (incapazes de produção de células T na sua maioria, mas com alguns modelos com inabilidade de gerar células B e/ou NK), por forma a evitar a rejeição³¹⁵ (figura 21). Este tipo de modelo foi um sucesso a larga escala, e hoje em dia é usado amplamente por investigadores para o estudo da carcinogénese do CRC e resposta a terapêuticas^{316–318}. Como os restantes modelos, estes também apresentam as suas limitações, nomeadamente a falta de capacidade de metastização, tendo motivado novas abordagens tais como injeção no baço, fígado e/ou veia porta, entre outros^{319–325}.



Figura 21. O rato Rowett Nude (RNU) é um animal atímico, e como tal deficiente em células T, exibindo atividade imune diminuída. Fonte: <https://www.criver.com/products-services/find-model/rnu-rat?region=3616>

Estas abordagens não representam uma verdadeira via de metástase, mas sim uma implantação heterotópica das células tumorais, que por vezes resultam em tumores muito infiltrativos que prejudicam estudos radiológicos e abordagens terapêuticas²⁹⁹. Outra limitação dos xenotransplantes, se forem sub-cutâneos, é a não reprodutibilidade do microambiente tumoral, fator bem reconhecido com influência no crescimento tumoral e metastização^{290,294,326–328}. Este tipo de modelos possibilita a detecção de células estaminais cancerígenas^{286,329,330}, mas não apresenta relação com invasão local e à distância. Não obstante estas limitações, é um modelo muito utilizado, principalmente em estudos com agentes terapêuticos.

3.5 Modelos ortotópicos

Uma metodologia para ultrapassar esta lacuna, foi o desenvolvimento de um modelo onde as células tumorais são inoculadas diretamente na posição anatômica de interesse, dando origem ao modelo ortotópico, também realizado em modelos animais imunocomprometidos³¹⁵. Estes modelos, quando comparados com os modelos de xenotransplante subcutâneos, apresentam uma maior percentagem de metástases à distância³³¹.

Em 1987, foi criado um modelo ortotópico de CRC em ratinhos, com injeção de células tumorais no cego, permitindo o estudo de invasão tumoral local bem como à distância, sendo por isso um modelo animal muito similar ao humano³³². Este modelo teve um elevado sucesso, tornando-se numa ferramenta valiosa para o estudo do CRC, e amplamente utilizado, por vezes com recurso a adaptações tais como injeção de células tumorais no reto^{333–337} e exploração dos diferentes padrões de microvascularização do cólon, nomeadamente dos bordos mesentéricos e antimesentéricos³¹⁰. O modelo foi refinado, com seleção artificial de células de CRC e com técnicas de engenharia genética que visaram criar modelos animais adequados aos estudos³³⁸. Em 2009, com recurso a técnicas cirúrgicas, foi possível a criação de um modelo ortotópico de CRC através da realização de uma cecostomia. Este modelo

representou uma inovação, pois permitiu a observação direta do tumor em tempo real e permite simultaneamente a obtenção de amostragens tumorais múltiplas³³⁹.

O modelo apresentava inúmeras vantagens, no entanto apenas considerava o cólon direito. À luz das diferenças embriológicas, anatômicas e fisiológicas³⁴⁰⁻³⁴³ e adicionando os achados de estudos genéticos recentes sobre a diversidade genética entre o cólon direito e cólon esquerdo³⁴⁴⁻³⁴⁸, um modelo ortotópico para o cólon esquerdo foi desenvolvido em 2012. Este modelo utilizou uma colostomia descendente e uma fístula mucosa-cutânea do cólon sigmoide, com inoculação das células tumorais nesta última localização, mantendo o outro topo funcionando e impedindo uma estenose cólica fatal³⁴⁹.

Alguns grupos não recorreram a técnicas cirúrgicas e efetuaram injeções de células tumorais no reto, utilizando meios mecânicos (*stents*) para prevenir a estenose, embora com resultados sem significância estatística³⁵⁰. Apesar do exposto, este método tem as suas limitações, com taxas de desenvolvimento tumorais variáveis entre 60 e 70% - explicáveis pela incorreta injeção das células tumorais na parede do cólon, pela baixa viabilidade das células tumorais e pela reação do animal hospedeiro às células neoplásicas³¹⁰; para além disso as metástases podem não se desenvolver no local de interesse, e quando o fazem, podem demorar bastante tempo³⁵¹. Nos últimos anos observou-se a aplicação de diferentes técnicas aos modelos ortotópicos, por forma a incrementar a taxa de sucesso do desenvolvimento tumoral, tal como eletrocoagulação, com aparente maximização da carcinogénese, local e à distância³⁵².

Outra abordagem foi o desenvolvimento de enxertos derivados de doentes (PDX), que consistem em recolher uma amostra tumoral de um humano e implantá-la num animal imunocomprometido, desta forma replicando o cenário humano (figura 22)³¹¹. Vários estudos foram realizados com PDX heterotópicos e ortotópicos, registando desenvolvimento de metástases quando implantados de forma ortotópica, detetável por métodos imagiológicos e com confirmação histológica³⁵³⁻³⁵⁵. Os modelos com recurso a PDX permitem uma preservação da arquitetura tumoral e estromal, com elevado grau de reprodutibilidade para com o tumor humano, a um nível microscópico, genético e funcional^{311,354}.

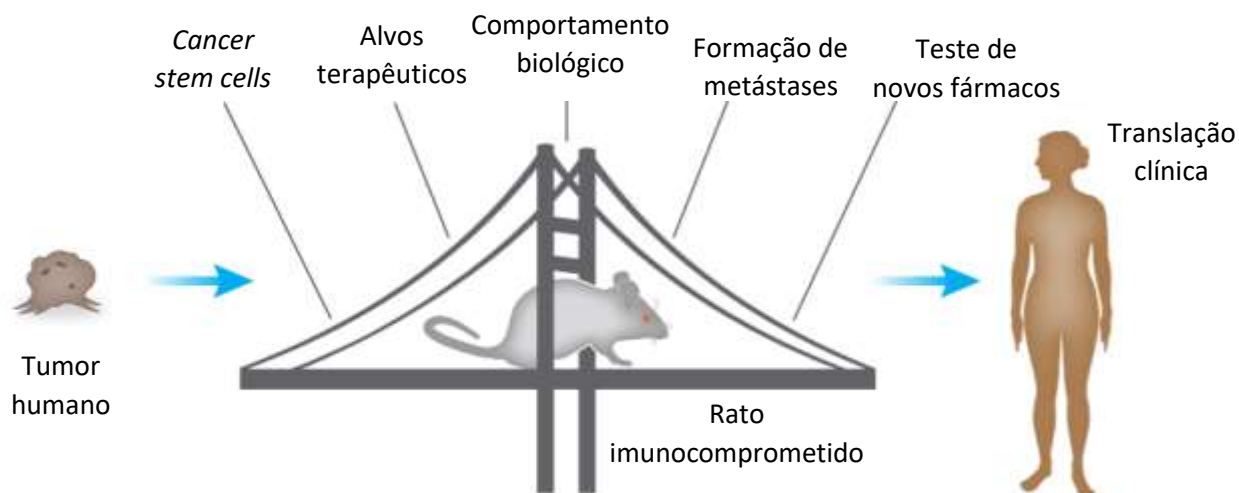


Figura 22. Os enxertos derivados de doentes (PDX) providenciam informação acerca de *cancer stem cells*, identificação de novos alvos terapêuticos, comportamento biológico, desenvolvimento de metástases e teste de novos fármacos, com possível translação para abordagens clínicas humanas. Adaptado de Walsh NC *et al.* (2017) Humanized Mouse Models of Clinical Disease Annu Rev Pathol Mech Dis.

Apesar de todas as características favoráveis descritas, o modelo apresenta limitações: as amostras são normalmente retiradas de doentes com tumores em estádios avançados de doença³⁵⁶ e de doentes que já foram submetidos a ciclos de quimioterapia³⁵⁴; existe ainda alguma discussão acerca da quantidade correta de tumor viável e ser implantada e da heterogeneidade tumoral³⁵⁷, bem como no que diz respeito às várias estirpes dos modelos animais e técnicas de enxerto³⁵⁴.

Recentemente uma nova desvantagem foi demonstrada, com a noção de que com o tempo o estroma tumoral humano do enxerto é substituído por estroma do animal recetor, embora as características histológicas do tumor se mantenham³⁵⁸⁻³⁶⁰, e esta substituição ocorre de forma acelerada em PDX de CRC³⁶¹. Alguns modelos animais foram desenvolvidos com ausência de células *natural killer*, nomeadamente os ratinhos *IL2rg^{null}* por forma a ultrapassar as limitações inerentes ao crescimento tumoral e metástases, mas mesmo nestas estirpes observa-se a substituição do estroma tumoral humano por estroma animal e embora a ausência de células NK seja benéfica para o crescimento tumoral, não permite o teste de fármacos de nova geração capazes de estimular as células NK e a sua atividade antitumoral³⁶⁰.

Uma abordagem complementar surgiu recentemente, utilizando isoenxertos, que consistem em colher fragmentos ou células tumorais de um rato, com posterior enxerto noutra rato geneticamente similar³⁶². Isto permitiria ultrapassar as duas grandes maiores limitações dos modelos dos xenotransplantes – incompatibilidade inter espécies e a questão de substituição do estroma, no entanto o modelo não é humano e é muito dispendioso no que diz respeito ao tempo e aos recursos utilizados³⁶³.

3.6 Modelos Animais Geneticamente Modificados (GEMM)

O desenvolvimento da engenharia genética possibilitou a criação de modelos genéticos de CRC, com múltiplas vantagens devido à quantidade de informação genética disponível hoje em dia e fácil manipulação génica³¹⁵, especialmente em genes relevantes no processo de carcinogénese³³¹. O aumento de conhecimento nestas áreas possibilitou de animais com anomalias genéticas indutoras de CRC tais como: cancro colorretal hereditário não polipoide^{364–366}, polipose adenomatosa familiar^{367,368} e melhoria dos modelos de polipose adenomatosa do cólon heterozigotos³⁶⁶ e modificadores do locus de neoplasia intestinal múltipla (Min)^{369,370}.

Para a maioria dos tumores, os GEMM podem ser utilizados para o estudo da doença e alvos terapêuticos, no entanto os modelos apenas possuem evidência no estágio iniciais da doença, com pouca evidência em estádios mais avançados³⁷¹. Os modelos GEMM não replicam o processo nativo de metástase, com baixo grau de disseminação, necessitando por isso de maior tempo para desenvolver doença secundária, e quando esta ocorre é altamente variável na localização, e como tal menos reprodutível³⁷². Para além desta desvantagem, alguns GEMM, tais como aqueles com mutações do gene *APC*, desenvolvem tumores no intestino delgado e não no cólon, e a carga tumoral diminui consideravelmente a vida do animal, limitando a progressão da doença e, conseqüentemente, a maioria dos animais não desenvolve doença à distância^{300,363}.

Limitações adicionais dos GEMM incluem maior heterogeneidade a nível tumoral, que poderá ser explicada por uma dieta mais variada e microbioma distinto nos humanos, bem como maior exposição a fármacos/toxinas no ser humano³⁷³; os animais não apresentam a variedade genética populacional presente nos humanos, e nos GEMM o tumor surge sempre derivado da mesma mutação genética, limitando as vias de sinalização passíveis de estudo³⁶³. De acordo com a mutação desenvolvida no animal, um viés que pode acontecer é o desenvolvimento de neoplasias noutras localizações que não a de interesse, por partilha da mesma mutação promotora³⁷⁴.

Os GEMM são particularmente eficazes para o estudo nas fases iniciais da doença, mas no que respeita a estádios mais avançados os modelos ortotópicos e com recurso a enxertos são manifestamente melhores³³¹. Uma representação esquemática dos modelos animais pode ser visualizada na figura 23.

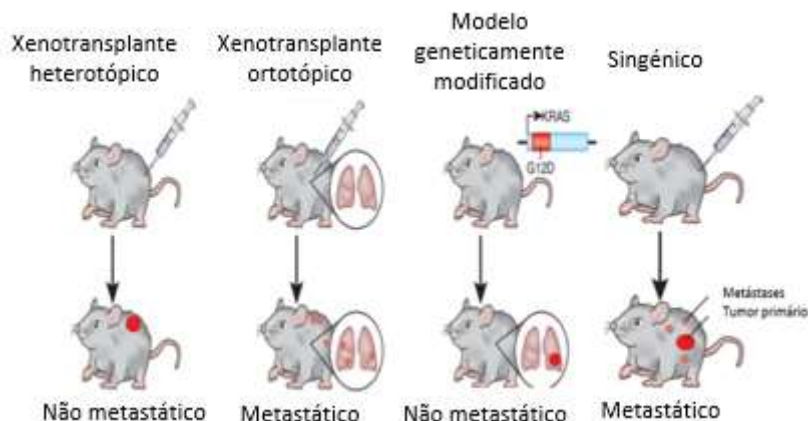


Figura 23. Tipos de modelos animais utilizados em oncologia. Os modelos podem derivar da injeção subcutânea de células tumorais humanas (xenotransplante heterotópico), inoculação de células tumorais humanas no local de origem das mesmas (xenotransplante ortotópico), de modificações genéticas para que os animais apresentem mutações num gene ou genes de interesse, ou ainda da transplantação singênica de células tumorais. No caso do modelo geneticamente modificado está representada uma limitação, que se traduziu no desenvolvimento de um tumor primário pulmonar e não de uma metástase, por via de mutação do gene KRAS. Adaptado de Francia, G., & Kerbel, R. S. (2010). Raising the bar for cancer therapy models. *Nature Biotechnology*, 28(6), 561–562. doi:10.1038/nbt0610-561

Pelo exposto, de todos os modelos disponíveis, os modelos ortotópicos parecem ser os eleitos para o estudo da carcinogénese, permitindo o estudo do microambiente e do processo metastático. Devido às características diferentes dos segmentos cólicos, a aplicação de modelos ortotópicos de cólon direito e cólon esquerdo, com estudo detalhado, permitirá novas considerações acerca da carcinogénese do CRC.

Capítulo III

Objetivos



Objetivos

O CRC é um problema de saúde pública, sendo atualmente o terceiro tipo de cancro mais comum, representando 10,2% da incidência total de cancro, e a segunda causa mais comum de morte relacionada com cancro⁷.

Os fatores de risco para o desenvolvimento de CRC são conhecidos, podendo ser genéticos ou ambientais³⁷⁵. Recentemente, o microambiente tem sido alvo de vários estudos com vista à sua caracterização profunda^{376,377}, a nível do tumor primário^{378,379} e secundário^{380,381}, pois a interação tumor-estroma é fundamental para o crescimento e invasão tumoral³⁸² e representa um valioso alvo terapêutico³⁸³.

Assim, o presente trabalho tem como objetivos:

- 1 – Estudar o efeito do microambiente tumoral no desenvolvimento e agressividade de CRC, nomeadamente no contexto de imunossupressão na sequência de transplante renal e/ou hepático.
- 2 – Estudar o efeito do microambiente tumoral no desenvolvimento e agressividade de metástases hepáticas de CRC, através dos seus padrões de crescimento histológicos, relacionando com sobrevivência global e implicações clínicas, com posterior comparação com os padrões de crescimento histológico das metástases hepáticas de carcinoma gástrico.
- 3 – Realização de um modelo animal ortotópico de CRC, com recurso a cecostomia – estudo do cólon direito, e transversostomia e fístula cutâneo-mucosa distal – estudo do cólon esquerdo, com vista a recriar o que se observou no humano.

Parte II
TRABALHO EXPERIMENTAL

Capítulo IV

Material e Métodos



Com vista a cumprir os desafios propostos, o estudo do microambiente tumoral e sua influência no carcinoma colorretal (CRC) e metástases hepáticas, o trabalho foi estruturado em duas vertentes.

Uma vertente clínica, contemplando o estudo do microambiente no desenvolvimento de CRC primário em doentes imunossuprimidos no contexto de transplante de órgão sólido e o estudo do microambiente no CRC metastático com abordagem dos padrões de crescimento histológicos.

O trabalho integra ainda uma vertente pré-clínica, que consiste no estudo de um modelo animal ortotópico de CRC, estabelecendo paralelismos com o que acontece na doença humana.

Nesse sentido, os materiais e métodos, assim como os resultados, serão estruturados em estudo clínico e em estudo pré-clínico.

1. Estudo clínico

1.1. Carcinoma colorretal e microambiente

A. Amostra em estudo

Foi efetuada uma revisão clínica e patológica de doentes, com diagnóstico de carcinoma colorretal (CRC) no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, no período entre janeiro de 2004 e dezembro de 2016, submetidos a transplante renal e/ou hepático prévio. Os critérios de inclusão foram idade superior a 18 anos e confirmação histológica de CRC. Os doentes que desenvolveram CRC antes do transplante foram excluídos. A informação clínica foi obtida através dos registos hospitalares.

Com base nos critérios estabelecidos foram incluídos no estudo 12 doentes, dez do género masculino e dois do género feminino, com mediana de idade de 60,5±13,4 anos (*range* 34-78), sendo que destes doentes, apenas três doentes (5%) tinham idade inferior a 50 anos. Um doente foi submetido a transplante hepático e renal, e como o transplante hepático ocorreu primeiro, foi integrado na coorte dos transplantados hepáticos para os efeitos desta investigação.

Assim sendo, a amostra consistiu em 12 doentes, cinco previamente submetidos a transplante hepático e sete a transplante renal.

No que concerne à localização do tumor, o CRC estava localizado no cólon direito em cinco doentes (41,7%) e no cólon esquerdo em sete (58,3%) e não havia tumores localizados no reto. Dois doentes (20%) não foram submetidos a cirurgia – diagnóstico confirmado por endoscopia e biópsia tumoral.

Relativamente a procedimentos cirúrgicos, foi realizada hemicolectomia direita em cinco doentes, hemicolectomia esquerda em dois, colectomia subtotal em dois e proctocolectomia em um.

A abordagem e tratamento dos doentes com CRC, incluindo tratamentos neoadjuvantes e adjuvantes (radioterapia e quimioterapia), bem como o seu *follow-up*, foram efetuados de acordo com o estabelecido nas *guidelines* internacionais da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO)^{134,160}, *National Comprehensive Cancer Network*^{384,385}, e Sociedade Americana de Cirurgia Colorretal³⁸⁶.

O estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e cumpriu com os princípios da Declaração de Helsínquia.

B. Estudo histológico

Foi revisto o material de arquivo de cada doente, disponível sob a forma de blocos de parafina, provenientes de peças cirúrgicas. Cada amostra foi revista após

coloração de rotina de Hematoxilina e Eosina (H&E), ocultada dos detalhes clínicos de cada doente, por dois patologistas experientes na área da patologia gastrointestinal.

O padrão de crescimento histológico do CRC foi definido de acordo com o descrito por Koelzer e Lugli³⁸⁷: padrão infiltrativo, caracterizado por uma disseção das estruturas da parede cólica por tecido tumoral com fraca resposta desmoplásica; e padrão expansivo, onde existe uma clara demarcação do tecido tumoral na frente invasora. Devido à necessidade de avaliar a interação tumor/hospedeiro, esta característica foi apenas avaliada em peças cirúrgicas.

A necrose tumoral foi aferida de acordo com o estipulado por Schneider e Langner³⁸⁸: necrose focal (em menos de 10% da área tumoral), moderada (10 a 30% da área tumoral) e severa (em mais de 30% da área tumoral). A resposta inflamatória foi igualmente alvo de avaliação, a nível do bordo invasor, de acordo com os critérios definidos por Klintrup *et al*¹⁹¹, com categorização em baixo grau (ausência de infiltrado inflamatório ou infiltrado inflamatório ligeiro) e alto grau (infiltrado inflamatório de intensidade moderada ou severa, normalmente associados a destruição tumoral). Os eosinófilos associados ao tumor foram avaliados de acordo com as recomendações de Fernández-Aceñero *et al*³⁸⁹: ausência de eosinófilos – grau 0; baixo número de eosinófilos (menos de 10 por campo de grande ampliação) – grau 1; grau intermédio de eosinófilos (10 a 50 por campo de grande ampliação) – grau 2; e elevado número de eosinófilos (superior a 50 por campo de grande ampliação) – grau 3. Esta avaliação foi executada apenas em peças cirúrgicas.

A instabilidade de microssatélites (MSI) foi testada de acordo com as recomendações definidas pelas *guidelines* clínicas da ESMO para CRC familiar³⁹⁰: um painel imuno-histoquímico com recurso a MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 foi utilizado, e caso ocorresse perda de MLH1, marcação imuno-histoquímica subsequente com BRAF seria efetuada. A avaliação de MSI foi realizada em todos os doentes.

O estudo da mutação de *TP53* nos CRC foi executado com recurso a marcação imuno-histoquímica para a proteína P53, de acordo com o definido por Akshatha *et al*³⁹¹: expressão para P53 em mais de 75% das células tumorais foi considerada um indicador de mutação *TP53*.

A presença de células *Natural Killer* (NK) foi avaliada como recurso a marcação imuno-histoquímica para CD56, de acordo com as recomendações de Schonocchia *et al*³⁹²: contabilizou-se o número de células NK por mm² e os tumores foram considerados positivos para células NK quando a contagem era superior a 4 células NK/mm². Este estudo foi realizado apenas em peças cirúrgicas.

A expressão de *Programmed death-ligand 1* (PD-L1) foi graduada de acordo com as *guidelines* estabelecidas para o carcinoma pulmonar de não pequenas células^{393–395}: sem marcação – score 0; marcação membranar e/ou citoplasmática em mais de 1% das células tumorais, mas em menos de 50% - score 1; marcação em mais de 50% das células tumorais – score 2. Esta marcação foi executada em todas as amostras do estudo doentes.

A presença de *cancer stem cells* (CSCs) foi pesquisada com recurso a marcação imuno-histoquímica para CD44, CD133 e ALDH1, tendo-se considerado um número elevado de CSCs quando ocorreu expressão dos marcadores referidos em mais de 50% das células tumorais.

As mutações *KRAS* foram realizadas com recurso à técnica de *real-time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), em cortes de tecido tumoral embebido em parafina com 10 µm de espessura, contendo um mínimo de 20% de células tumorais, identificadas com recurso a plataforma Idylla (Biocartis, New Jersey, EUA). Se não fossem identificadas mutações *KRAS*, seria executada sequenciação subsequente para deteção de mutações *NRAS* e *BRAF*. O estudo genético foi efetuado em todas as amostras.

1.2. Metástases hepáticas de carcinoma colorretal

A. Amostra em estudo

Para esta tarefa foram revistos os dados clínicos e patológicos de 142 doentes submetidos a ressecção hepática por metástase de carcinoma colorretal (CRCLM), no período de janeiro de 2010 a julho de 2013, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, tendo-se recolhido informação clínica e demográfica dos registos hospitalares. Doze doentes foram excluídos por informação clínica incompleta e material histológico inadequado. Os doentes submetidos a re-hepatectomias (20) foram igualmente excluídos.

Após aplicação dos critérios de inclusão, foram considerados 110 doentes, 81 de género masculino e 29 do género feminino, com mediana de idades de 63 \pm 10 anos (*range* 33-82), registando-se idade superior ou igual a 70 anos em trinta e três doentes (30%). Com respeito à localização do tumor primário, registou-se origem no cólon em 73 doentes (66,4%) e no reto em 32 (29,1%), sendo que cinco doentes (4,5%) apresentavam tumores síncronos no cólon e no reto.

Relativamente ao estadiamento tumoral, 73 (66,4%) doentes tinham doença metastática ganglionar. No que se refere à metastização hepática, quarenta e sete doentes (42,7%) tinham um único nódulo metastático e sessenta e três (57,3%) apresentavam múltiplas metástases, com uma média de 2,62 \pm 2,31 metástases por doente (*range* 1-13). Sessenta e dois doentes (56,4%) exibiram metástase hepática com diâmetro máximo superior a 3 cm, com diâmetro máximo médio de 4,26 \pm 3,15 cm (*range* 0,7-17). No que concerne à localização das lesões hepáticas, a distribuição foi unilobar em 69 doentes (62,7%) – 38 no lobo direito e 31 no lobo esquerdo hepático, com distribuição bi-lobar em 41 (37,3%).

Cinquenta e sete doentes (51,8%) tinham metástases hepáticas síncronas, e destes 12 foram submetidos a ressecção hepática síncrona com o carcinoma primário colorretal. Os restantes 45 doentes foram submetidos a ressecções metácronas, tendo-se executado em oito destes doentes (7,3%) uma abordagem cirúrgica “*Liver first*”.

Os restantes 53 doentes (48,2%) apresentaram metástases hepáticas metácronas.

As características clínicas destes doentes podem ser consultadas na tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas dos doentes submetidos a hepatectomia por metástases hepáticas por carcinoma colorretal.

Parâmetros	Número de doentes (%)
Género	
Feminino	29 (26)
Masculino	81 (74)
Idade inferior a 70 anos	77 (70)
Idade igual ou superior a 70 anos	33 (30)
Localização do tumor primário	
Cólon	73 (66,4)
Reto	32 (29,1)
Cólon e Reto	5 (4,5)
Status ganglionar linfático	
Gânglios linfáticos positivos	73 (66,4)
Gânglios linfáticos negativos	37 (33,6)
Número de metástases hepáticas	
Metástase solitária	47 (42,7)
Metástases múltiplas	63 (57,3)
Maior diâmetro da metástase	
< 3 cm	48 (43,7)
≥ 3 cm	62 (56,3)
Localização	
Unilobar	69 (62,7)
Bilobar	41 (37,3)
Apresentação da metástase hepática	
Síncrona	57 (52)
Metácrona	53 (48)

O estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e cumpriu com os princípios da Declaração de Helsínquia.

B. Quimioterapia neoadjuvante (QTNA)

De acordo com o estipulado por Adam *et al.*³⁹⁶ as principais contra-indicações para ressecção hepática são a impossibilidade de obter uma ressecção R0 com mais de 30% de volume hepático remanescente, presença de doença extra-hepática não ressecável, número de lesões superior a 5, progressão tumoral e ou possibilidade remota de conseguir uma ressecção R0 com recurso apenas a procedimentos complexos.

No entanto, o uso de QTNA veio expandir os limites da ressecabilidade cirúrgica das metástases hepáticas de carcinoma colorretal³⁹⁷, especialmente ao possibilitar uma ressecção cirúrgica com margens cirúrgicas negativas³⁹⁸. Os doentes são seleccionados para QTNA em função da sua carga tumoral e do seu estado geral, e avaliados com *scores*

específicos, tais como o score de Karnofsky³⁹⁹ ou o score *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG)⁴⁰⁰.

Mesmo em doentes candidatos a cirurgia, em que esta seja tecnicamente fácil, mas cujo prognóstico não seja excelente, o uso de QTNA deverá ser a primeira opção. Em doentes oligometastáticos, o uso de QTNA deverá ser considerado para que o doente transite para um *status* cirúrgico, ou seja, tornar um doente inicialmente não candidato a cirurgia com potencial curativo num doente com elevada possibilidade de cura após cirurgia. Nestas circunstâncias, a quimioterapia com base em oxaliplatina (FOLFOX) e com base em irinotecano (FOLFIRI) são as mais utilizadas, isoladas ou em combinação com um anti-EGFR (se o CRC for *KRAS wild-type*) ou bevacizumab (se o CRC exibir mutação do *KRAS* ou *BRAF V600E*)^{401,402}.

No CHUC, o uso de QTNA é decidido em reunião multidisciplinar, caso a caso, sendo que normalmente é utilizada em doentes com doença metastática síncrona bem como em doentes com elevada carga tumoral (com apresentação síncrona ou metácrona), e que sejam potencialmente ressecáveis, mas com necessidade de sacrifício cirúrgico de estruturas vasculares e biliares *major* ou hepatectomia extensa. A escolha do agente quimioterápico depende do estado geral do doente, uso de quimioterapia prévia, *status* do gene RAS e preferência do oncologista.

O uso de QTNA e a escolha dos seus agentes são baseados com o estabelecido nas *guidelines* internacionais da Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO)^{134,160}, *National Comprehensive Cancer Network*^{384,385}, e Sociedade Americana de Cirurgia Colorretal³⁸⁶.

Na nossa coorte, 52 doentes (47,3%) receberam QTNA, com 44 destes doentes a serem sujeitos a apenas uma linha de quimioterapia e sete doentes a duas linhas. A mediana de ciclos de quimioterapia foi de 11,2±5,5 ciclos (*range* 4-26).

A quimioterapia mais utilizada teve por base o irinotecano (FOLFIRI), tendo sido utilizada em 37 doentes (33,6%), seguida da quimioterapia baseada em oxaliplatina (FOLFOX), utilizada em 15 doentes. A monoterapia com 5-fluoracilo foi utilizada apenas em um doente (0,9%). A terapêutica com anticorpos monoclonais, com Bevacizumab foi utilizada em 22 casos (20%) e, com cetuximab em 16 (14,5%). Cinquenta e oito doentes (52,7%) não foram sujeitos a QTNA.

O regime de QTNA utilizada nos doentes está resumido na tabela 4.

Tabela 4. Regimes de quimioterapia administrados aos doentes submetidos a hepatectomia por metástases hepáticas de carcinoma colorretal. FOLFOX – quimioterapia baseada em oxaliplatina; FOLFIRI – quimioterapia baseada em irinotecano.

	Número de doentes (%)
Quimioterapia neoadjuvante	
Não	52 (47,3)
Sim	58 (52,7)
Uma linha	44 (40)
Duas linhas	7 (6,4)
FOLFOX	15 (13,6)
FOLFIRI	37 (33,6)
5-Fluoracilo	1 (0,9)
Bevacizumab	22 (20)
Cetuximab	16 (14,5)

C. Detalhes operatórios / Procedimentos cirúrgicos

A realização de hepatectomias foi de acordo com o descrito previamente¹⁶⁵. Antes da cirurgia foram determinados os marcadores serológicos de função hepática – aminotransaminases (aspartato (AST) e alanino aminotransferases (ALT)), bilirrubina, gamaglutamil transpeptidase, *International Normalized Ratio* e contagem de plaquetas. Foram ainda determinados a razão AST/ALT, a razão AST/plaquetas e o score fibrose 4, de acordo com Ratti *et al*⁴⁰³.

A ecografia intraoperatória foi efetuada por rotina em todos os doentes. A secção do parênquima foi realizada com disseção ultrassónica – *CUSA (Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator)* ou técnica de *Kelly-clamp crush*, com modulação do fluxo hepático a nível do pedículo – clampagem de 15 min com 5 min de reperfusão, de acordo com o descrito por Tralhão *et al*⁴⁰⁴.

Quarenta (36,4%) doentes foram sujeitos a hepatectomia *major*, definida como a ressecção de mais de três segmentos hepáticos e 70 doentes (63,6%) foram submetidos a hepatectomia *minor*, três dos quais por via laparoscópica.

As complicações cirúrgicas foram classificadas de acordo com a classificação de Dindo-Clavien até ao 90º dia pós-cirúrgico⁴⁰⁵. Registou-se mortalidade pós-operatória em quatro doentes (3,6%), três devido a falência hepática pós hepatectomia, de acordo com o descrito por Balzan *et al*.⁴⁰⁶ e um por trombose da veia porta. Nove doentes apresentaram morbidade *major*. O tempo médio de internamento hospitalar foi de 10 dias (*range* 3-35).

D. Análise histológica

Para este procedimento foi efetuada uma revisão de material de arquivo de cada doente por dois patologistas experientes na área da patologia hepatobiliar, sem conhecimento dos dados clínicos. A revisão teve por alvo o parênquima tumoral – *status*

da margem de ressecção cirúrgica, grau de regressão tumoral, espessura do tumor na interface com o parênquima não tumoral e o padrão de crescimento das CRCLM. As margens cirúrgicas foram avaliadas para todas as metástases, tendo sido categorizada a margem menor em cada doente como: R0 (margem cirúrgica ≥ 1 mm) e não R0 (R1: margem < 1 mm ou R2: envolvimento macroscópico da margem cirúrgica).

O grau de regressão tumoral (TRG) foi avaliado de acordo com o estipulado por Rubbia-Brandt *et al.*²⁵⁶. Este score visa a classificação em 5 TRGs de acordo com a percentagem de tumor viável residual e a extensão de fibrose: TRG 1 corresponde à ausência de tumor residual, com fibrose abundante; TRG 2 corresponde a escasso tumor viável, num estroma com abundante fibrose; TRG 3 a tumor residual mais viável num estroma predominantemente fibroso; TRG 4 to tumor residual extensamente viável, predominando sobre a fibrose; TRG 5 a tumor extensamente viável com rara fibrose. Os tumores foram posteriormente categorizados quanto à pior resposta tumoral em cada doente como ausente (TRG5) ou presente (TRG 1 a 4). Um esquema representativo de cada TRG pode ser visto na Fig. 24.

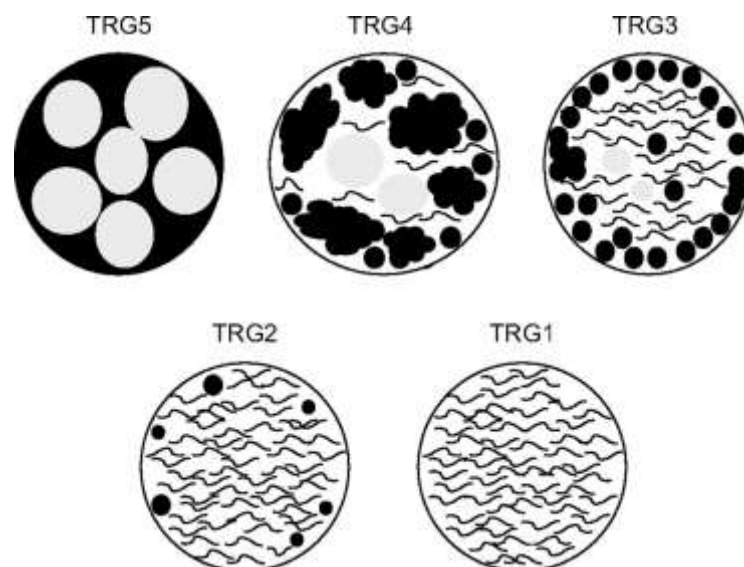


Figura 24. Esquema representativo de cada grau de regressão tumoral (TRG). TRG1 – ausência de tumor residual e grande quantidades de fibrose; TRG2 – raras células tumorais residuais dispersas num fundo com fibrose abundante; TRG 3 – maior quantidade de tumor viável, mas a fibrose é o achado dominante; TRG 4 – tumor viável predomina sobre a fibrose; TRG 5 – sem sinais de regressão. Áreas negras: células tumorais; áreas a cinzento: necrose; fibras: fibrose.

Figura disponível em: L Rubbia-Brandt *et al.* Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery *Annals of Oncology*, Volume 18, Issue 2, February 2007, Pages 299–304, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl386>; © 2006 European Society for Medical Oncology

A espessura do tumor na interface com o parênquima não tumoral (TTNI) foi calculada de acordo com o descrito por Dipen Maru *et al.*²⁷¹ – valor da maior espessura de tumor contínuo na periferia da lesão tumoral, excluindo áreas de necrose, com definição de dois grupos: TTNI $< 0,5$ mm e TTNI $\geq 0,5$ mm.

No que diz respeito à avaliação do padrão de crescimento das CRCLM, este foi definido de acordo com o convencionalizado por Vermeulen *et al.*^{255,268} em quatro grupos: expansivo, infiltrativo, desmoplásico e misto. O padrão foi definido como expansivo se o tumor induzisse compressão dos hepatócitos adjacentes, sem reação estromal e com infiltrado inflamatório ligeiro; infiltrativo quando as células tumorais cresciam de forma insinuada nos sinusoides hepáticos ou nas trabéculas hepatocitárias, substituindo os hepatócitos; desmoplásico se estivesse presente uma banda de estroma contendo linfócitos e pequenos vasos na interface tumor-parênquima não tumoral. Por forma a ser classificado, o padrão deve representar mais de 70% da área tumoral. Se um ou mais padrões estivessem presentes e se este critério não se cumprisse, o padrão foi designado de misto. A representação esquemática e histológica dos padrões de crescimento pode ser visualizada nas figs. 25 e 26.

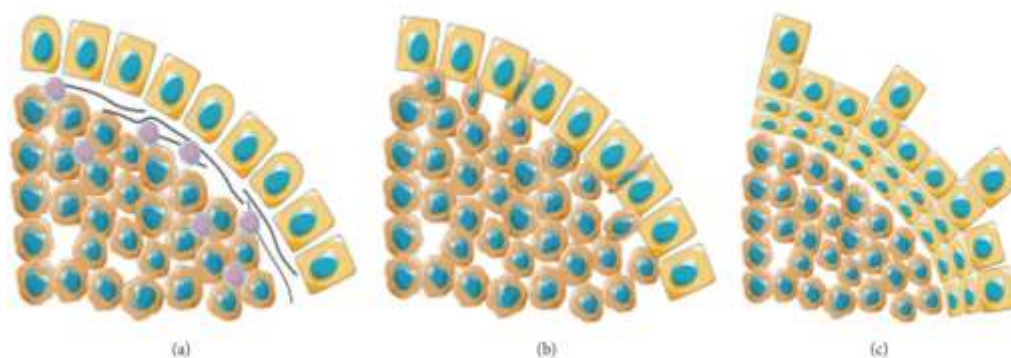


Figura 25. Representação esquemática dos padrões de crescimento das metástases hepáticas de carcinoma colorretal – a) Padrão de crescimento desmoplásico: o tumor está separado do parênquima hepático por uma banda de tecido fibroso; b) Padrão de crescimento infiltrativo: o tumor permeia por entre os hepatócitos, sem ruptura da arquitetura do fígado adjacente; c) Padrão de crescimento expansivo: o tumor comprime os hepatócitos adjacentes.

Reproduzido de Caetano Oliveira R *et al.* Liver Metastases and Histological Growth Patterns: Biological Behavior and Potential Clinical Implications—Another Path to Individualized Medicine? *Journal of Oncology* Volume 2019, Article ID 6280347, 6 pages

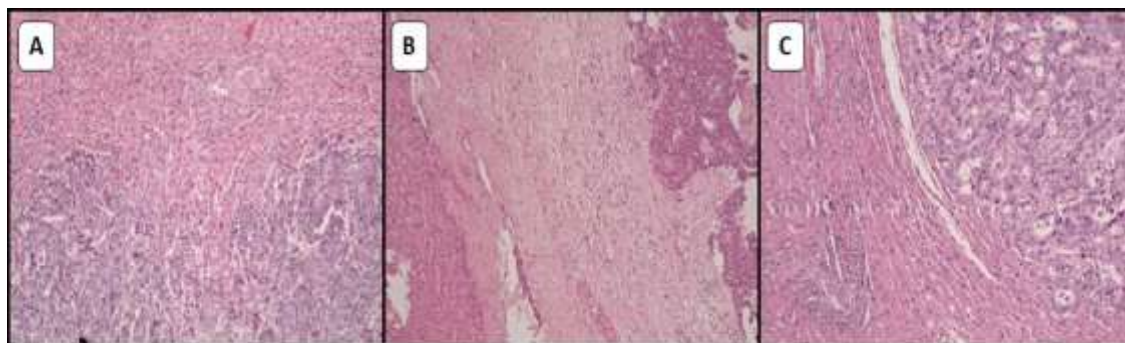


Figura 26. Padrões histológicos das metástases hepáticas de carcinoma colorretal: A) padrão de crescimento infiltrativo – o tumor permeia por entre as trabéculas e sinusoides, mas sem interrupção da arquitetura hepática, H&E 100x; B) padrão de crescimento desmoplásico – o tumor está separado por uma banda de tecido fibrose, contendo linfócitos, H&E 100x; C) padrão de crescimento expansivo – o tumor expande e comprime os hepatócitos adjacentes, H&E 100x. Imagem disponível em: Falcão D. et al. Histopathologic patterns as markers of prognosis in patients undergoing hepatectomy for colorectal cancer liver metastases: Pushing growth as an independent risk factor for decreased survival. *Eur. J. Surg. Oncol.* (2018). doi:10.1016/j.ejso.2018.03.02.

1.3. Metástases hepáticas de carcinoma gástrico

A. Amostra em estudo

Neste âmbito foi efetuada uma revisão de dados clínicos e patológicos de doentes submetidos a ressecção cirúrgica de metástases hepáticas de carcinoma gástrico (GCLM), com intenção curativa, no período entre fevereiro de 1997 e novembro de 2017. Os doentes foram considerados aptos para hepatectomia após decisão em reunião multidisciplinar: performance *status* aceitável, ausência de doença metastática extra-hepática e possibilidade de obtenção de margem de ressecção cirúrgica com morbimortalidade mínima.

No CHUC os casos com bom comportamento biológico, ou seja, com evolução clínica favorável e níveis baixos de marcadores tumorais, mesmo em casos de apresentação síncrona, a ressecção cirúrgica metácrona foi a abordagem preferencial.

O estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e cumpre com os princípios da Declaração de Helsínquia.

Foram estudados 19 doentes, 13 do género masculino e seis do género feminino, com mediana de idades de $66,3 \pm 9,9$ anos (*range* 44-79). Catorze doentes (73,7%) tinham idade superior a 60 anos. As metástases foram síncronas em 16 doentes (84,2%), dos quais sete foram submetidos a ressecção gástrica e hepática síncrona. A mediana de intervalo de tempo entre o diagnóstico e a hepatectomia foi de $5,1 \pm 6,2$ meses e a mediana de intervalo entre a ressecção gástrica e a hepatectomia foi de $6,2 \pm 6,7$ meses. Três doentes (15,8%) apresentavam uma distribuição bilobar das metástases hepáticas. A mediana do maior diâmetro das metástases foi de $3,37 \pm 2,38$ cm.

No que diz respeito ao tumor primário, um dos doentes (5,3%) apresentava duas lesões primárias – localizadas no antro e no cárdia, tendo os restantes 18 doentes lesões únicas. Nos doentes com lesões únicas, o tumor encontrava-se na junção gastroesofágica (JGE) e fundo gástrico em três (16,6%), no corpo gástrico em dez (55,6%) e no antro em cinco (27,8%). Todos os tumores da JGE eram do tipo III de Siewert. A mediana de tamanho tumoral foi de $5,8 \pm 2,5$ cm (*range* 1,5-10,5). Quatro doentes (21,1%) não tinham metástases ganglionares linfáticas e 15 doentes apresentavam envolvimento ganglionar da seguinte forma: N1 em dois (10,5%), N2 em seis (31,6%) e N3 em sete (36,8%).

O score da *Association Française de Chirurgie (AFC)* de acordo com o descrito por Adam *et al*⁴⁰⁷ foi utilizado, tendo-se obtido uma mediana de cinco (*range* 4-9).

B. Quimioterapia

Dois doentes (10,5%) foram submetidos a QTNA previamente à ressecção gástrica. Doze (63,2%) receberam quimioterapia adjuvante e um (5,3%) foi sujeito a radioterapia adjuvante.

No que diz respeito às metástases hepáticas, a QTNA foi utilizada em 13 doentes (64,8%) e em oito doentes (42,1%) foi empregue quimioterapia adjuvante.

C. Detalhes operatórios / Procedimentos cirúrgicos

A técnica cirúrgica para a realização de hepatectomia foi descrita previamente¹⁶⁵. Hepatectomia *major* foi efetuada em três doentes (15,8%), com ressecção anatômica em dez (52,6%) casos. Não foram efetuadas ressecções laparoscópicas.

As complicações cirúrgicas foram graduadas de acordo com a classificação de Dindo-Clavien até ao 90º dia pós-cirúrgico⁴⁰⁵, conforme descrito previamente. A falência hepática pós hepatectomia foi definida de acordo com o descrito por Balzan *et al.*⁴⁰⁶ e a sua severidade graduada com o disposto por Rahbari *et al.*⁴⁰⁸. Biloma ou fuga biliar foi definida de acordo com o estipulado por Koch *et al.*⁴⁰⁹ e hemorragia pós hepatectomia como explanado por Rahbari *et al.*⁴¹⁰.

D. Análise histológica

A revisão do material de arquivo de cada doente foi efetuada por dois patologistas experientes na área da patologia hepatobiliar, sem conhecimento dos dados clínicos. O estudo teve por alvo características do tumor primário tais como: maior diâmetro, localização, classificação de Lauren, classificação da OMS, profundidade de invasão, padrão de crescimento, gradação do tumor, resposta inflamatória e invasão linfovascular⁴⁹. Todos os tumores foram estadiados ou re-estadiados de acordo com a classificação TNM, 8ª edição⁴⁹.

As características dos tumores gástricos, nomeadamente tamanho, localização, subtipos macroscópicos, padrões de crescimento e invasão vascular foram definidas de acordo com a 3ª edição da Associação Japonesa de Carcinoma Gástrico⁴¹¹. Os subtipos histológicos foram classificados em tubular, papilar, mucinoso, de tipo misto, de células pouco coesas e de nenhum tipo especial (NOS), de acordo com o preconizado na classificação da OMS⁴⁹. A expressão do recetor epidermoide humano (HER)-2 foi detetada com recurso a imuno-histoquímica e graduada como negativa (score 0 e 1+), equívoca (2+) e positiva (3+), de acordo com o descrito na OMS⁴⁹.

No que diz respeito ao estudo das metástases, foram avaliadas características tais como tamanho da maior lesão, margens de ressecção, padrão de crescimento, resposta inflamatória, TRG, TTNI e expressão de Her-2.

As margens de ressecção foram categorizadas de forma similar ao tumor primário em R0, R1 e R2. O estudo do padrão de crescimento foi definido como o descrito previamente²⁵⁵, assim como o TRG e o TTNI.

O estudo da expressão de Her-2 foi efetuado de forma análoga ao tumor primário.

2. Estudo pré-clínico

A. Animais para o estudo

Cinquenta e cinco ratos machos da estirpe RNU, com idades compreendidas entre oito e dez semanas, foram adquiridos ao Laboratório Internacional Charles River (Espanha). Os animais tinham acesso ilimitado a comida e água, estavam acondicionados em jaulas com controlo individual de temperatura e humidade, com ventilação, e sujeitos a ciclos de luz/escuridão de 12h.

Os estudos animais foram aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (ref CE-129/2011) para os estudos animais, em conformidade com o disposto para os direitos internacionais de estudos animais para investigação biomédica.

B. Linhas tumorais de carcinoma colorretal

Três linhas distintas de CRC foram obtidas da Coleção de Cultura Americana (ATCC): WiDr (CCL-218™), C2BBe1 (CRL-2102™) e LS1034 (CRL-2158™). A linha celular WiDr foi obtida de um carcinoma da junção retosigmoide de uma mulher com 78 anos; a linha C2BBe1 de um CRC distal de um homem de 72 anos; e a linha LS1034 de um CRC em localização proximal de um doente com 54 anos. Todas as linhas foram mantidas a uma temperatura de 37°C, num ambiente com 5% de CO₂, em meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina), 1% de solução de L-glutamina e 1% de solução de piruvato de sódio.

Uma vez que todas as linhas celulares utilizadas foram mantidas em condições aderentes, para a sua manipulação foi necessário destacar as células dos frascos e preparar suspensões celulares. Para tal recorreu-se a tripsina-EDTA (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*) a 0,25% (GIBCO 25200, Reino Unido) (20 mg/mL de EDTA, 500 mg/mL de tripsina – enzima proteolítica que quebra ligações das proteínas de adesão entre células e entre células e matriz extracelular), e uma solução salina de tampão fosfato – PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) (Sigma, USA).

Para a manutenção da cultura de células foram utilizados diferentes materiais tais como frascos de cultura de poliestireno (75 e 175 cm² – Sarstedt, USA); tubos de Falcon (15 e 50 mL; Sarstedt, USA); pipetas de Pasteur; pipetas de vidro graduadas; microtubos (1,5 e 2 mL; Eppendorf, Alemanha); micropipetas (Pipetman – Gilson, France); pipetador (IBS Integra Biosciences, Alemanha) e bomba de vácuo (IBS Integra Biosciences, Alemanha).

Relativamente ao equipamento utilizado para realizar a cultura celular utilizou-se uma câmara de fluxo laminar vertical (Steril-Polaris, Itália); centrífuga refrigerada de bancada (D-78532 Tuttlingen, Hettich Zentrifugar, Universal 320R; Rotor: 6318, Portugal); incubadora (Binder, Portugal); microscópio ótico invertido e direto (Motic AE31, Hg 100W, China); sistema de purificação de água Simplicity™ da Millipore S.A.,

USA; incubadora HeraCell 150 (Alemanha); frigorífico (4°C (Indesit, Polónia)) e arcas congeladoras (-20°C (Samsung, Coreia) e -80°C (Snijders Scientific, Holanda)).

As linhas celulares em estudo são linhas aderentes e crescem em monocamada. Durante a manipulação celular, sempre que as culturas atingiam cerca de 90% de confluência, foram estabelecidas novas culturas (geralmente a cada 2 semanas) – processo designado de “passagem”, visando a manutenção das linhas celulares. Para iniciar a cultura celular o frasco contendo a linha celular pretendida foi retirado da arca a -80°C ou de azoto líquido, sendo descongelado parcialmente em banho-maria a 37°C. Na câmara de fluxo laminar vertical transferiu-se a suspensão celular para um frasco de 175 cm² contendo previamente meio DMEM a 37°C de temperatura e 48 horas após o descongelamento mudou-se o meio de cultura. Para a manutenção da linha celular aspirou-se o meio DMEM consumido do frasco contendo as células e lavou-se o frasco de cultura com PBS. Aspirou-se o PBS, adicionaram-se 3 mL de tripsina-EDTA 0,25% e colocou-se o frasco de cultura a incubar durante breves minutos a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ em ar, por forma a destacar as células. O destacamento celular foi então confirmado ao microscópio e adicionado novo meio de cultura, com posterior ressuspensão. Distribuiu-se a suspensão por novos frascos de modo a obter uma densidade adequada e adicionou-se meio de cultura até perfazer o volume correto (consoante o frasco utilizado) e deixou-se a incubar a 37°C numa atmosfera de ar com 5% de CO₂ até à próxima passagem. Nunca foram excedidas as 50 passagens.

C. Caracterização das linhas celulares de CRC

As linhas celulares de CRC foram submetidas a caracterização morfológica e imuno-histoquímica. As células foram centrifugadas numa Citocentrífuga Shandon Cytospin II, a 1300 rpm durante 3 min, e posteriormente coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e coloração de Papanicolau; foi efetuada posterior centrifugação do material remanescente com recurso a uma Centrífuga Heraeus Sepatech Labofuge Ae, a 1500 rpm durante 5 min, com inclusão em parafina para estudos imuno-histoquímicos.

A expressão de CK20 e CDX2 foi testada por forma a inferir o grau de diferenciação tumoral; a expressão de P53 foi avaliada, pois a sua sobreexpressão está associada a fases finais da carcinogénese, e conseqüente a tumores mais agressivos; a marcação para o Ki67 representa o índice proliferativo; a expressão de vimentina está associada à transição epitélio-mesénquima; a marcação para E-caderina, Beta-catenina e antigénio carcino-embriónico (CEA) está associada a ativação de vias de sinalização; a expressão de CD44 e CD113 permite a identificação de células estaminais cancerígenas.

A expressão de CK20 (marcação citoplasmática) e de CDX2 (marcação nuclear) foi efetuada de modo qualitativo de acordo com a intensidade e distribuição de marcação imuno-histoquímica em focal (F) e difusa (D), fraca (W) e forte (S); expressão de P53 foi graduada de acordo com a percentagem de expressão das células neoplásicas: 0 – sem expressão; 1 – expressão em 1 a 25%; 2 – expressão em 26-50%; 3 – 51-75%; 4 – 76-100%; a marcação para o Ki67 foi descrita em percentagem de células neoplásicas

a expressar o marcador; a marcação para CEA foi avaliada de acordo com a intensidade (sem marcação, fraca, moderada ou forte); a marcação positiva para E-caderina foi categorizada em ausente, fraca e incompleta ou completa; a marcação para Beta-catenina foi dicotomizada em membranar ou nuclear; a expressão de vimentina, CD44 e CD113 foi descrita como presente ou ausente.

O teste de instabilidade de microssatélites foi efetuado de acordo com as *guidelines* definidas pela Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) para risco familiar de CRC³⁹⁰: a primeira abordagem foi realizada com um painel imuno-histoquímico com MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2; nos casos de perda da marcação para MLH1, marcação subsequente com BRAF V600E foi efetuada.

D. Testes de citotoxicidade

Foram utilizados produtos de leucoferese de sangue periférico de 20 dadores saudáveis – homens e mulheres, com idades compreendidas entre os 20 e 40 anos, provenientes do Instituto Português do Sangue e da Transplantação, por forma a enriquecer as suspensões de células *Natural Killer* (NK) humanas. Este procedimento teve a autorização da Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (CE-025/2016) e foi obtido consentimento informado de todos os dadores.

As células mononucleadas de sangue periférico foram obtidas por gradientes de densidade utilizando Ficoll-Paque® e ressuspensas em meio de cultura celular Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, suplementado com GlutaMAX (*L-glutamine amino acid supplement*) (Life Technologies, Carlsbad, USA), 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina-estreptomicina (10.000 unidades de penicilina e 10 mg de estreptomicina/mL). As células NK foram obtidas por seleção negativa via separação magnética (*magnetic-activated cell sorting* – MACS), com recurso a um *kit* comercial *Human NK Cell Isolation*, de acordo com as instruções do fabricante.

A estimulação *in vitro* das células NK foi efetuada com adição de 100 IU/mL de interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2) (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) a 1×10^6 células NK durante 24h, seguida de co-cultura com as linhas celulares de CRC supra descritas e incubadas a 37°C, em ar com 5% CO₂. A expressão da desgranulação de CD107a (*Lysosomal-associated membrane protein 1; LAMP-1*)^{412,413} foi efetuada em co-culturas de células NK com linhas celulares de CRC, não estimuladas (NS) e estimuladas com rhIL-2, em placas pré-preparadas de 96 poços, com *ratio* efetor/alvo de 3:1 – incubado por uma hora, com posterior adição de 5 µg/mL de brefeldina A (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) e incubação com anti-CD107a por 4 horas.

Posteriormente as células foram recolhidas, fixadas e permeadas, com coloração intracelular com anticorpos anti-IFN-γ e marcação membranar com fluorocromos conjugados para CD3, CD16 e CD56 (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). A análise das marcações foi efetuada com recurso a citometria de fluxo no citómetro BD FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, USA). A aquisição de dados recorreu a *software* específico

BD FACSDiva 6.1.3 e os mesmos foram analisados com software FlowJo 10.0.7 version (Tree Star Inc, Ashland, USA).

E. Técnica cirúrgica dos modelos ortotópicos de cego e cólon sigmoide

A técnica cirúrgica para o modelo ortotópico do cólon sigmoide foi baseada na inicialmente descrita em 2012³⁴⁹, com as devidas modificações atendendo ao animal utilizado nesta experiência. Os 55 animais – ratos RNU, foram submetidos a jejum pré-operatório de 12h, com registo do peso no dia de cirurgia. A anestesia foi conseguida com injeção subcutânea de 2 µL/g de uma solução de ketamina (50 mg/mL) (Ketalar®, Parke-Davis, Pfizer Laboratories Ltd., Portugal) e clorpromazina a 2.5 % (Largactil®, Rhône-Poulenc Rorer, Victoria Labs, Portugal), num ratio 3:1, recorrendo a uma seringa com 1 mL e agulha hipodérmica 25 G. Após avaliação dos indicadores de indução anestésica, o animal foi colocado no campo cirúrgico e o abdómen foi esterilizado com iodopovidona.

A derivação do cólon consistiu na confecção de uma colostomia descendente com fístula cutâneo-mucosa do cólon sigmoide. Foi efetuada uma incisão mediana no abdómen inferior, com 1,5 cm de comprimento. Após a abertura da cavidade abdominal, o cego foi exposto permitindo uma melhor visualização do cólon distal – normalmente localizado à esquerda da linha média. Se necessário, a confirmação pode ser obtida com uma tração ligeira do cólon, induzindo movimento do orifício anal. Na grande maioria dos casos uma ansa de intestino delgado está aderente ao mesocólon, mas é facilmente destacável com uma tração ligeira – alguma cautela é necessária por forma a não lesar as estruturas vasculares. Após a referenciação do cólon distal, o cego é recolocado dentro da cavidade abdominal por forma a prevenir desidratação da serosa.

O local ótimo para abertura do cólon é então selecionado tendo em conta o comprimento da arcada vascular e dos topos intestinais, por forma atingir o plano cutâneo sem induzir tensão. Efetua-se a abertura do mesocólon e clampagem da arcada vascular – dois clamps e fio (vicryl 4/0 – Ethicon, New Jersey, EUA), deixando um dos topos do fio comprido para referenciação, com posterior secção do cólon e dos vasos.

O estoma foi construído à esquerda da linha média, em localização abdominal média/alta, no que diz respeito ao topo da colostomia; relativamente ao topo retal, o estoma foi criado no abdómen inferior, à esquerda da linha média. O estoma retal não deverá ser muito lateral e distal, caso contrário dificultará a locomoção do animal. Os dois topos tinham sempre uma distância entre si igual ou superior a 1 cm.

Para o efeito, realizou-se uma incisão circular na pele, com cerca de 0,5 cm de diâmetro, com remoção de uma porção de aponevrose e tecido muscular da parede anterolateral do abdómen. O fio longo do clamp supra elencado foi utilizado como referência, caso os topos caíssem inadvertidamente dentro da cavidade abdominal, mas também serviam para uma melhor manipulação e assinalar a orientação natural do

cólon, diminuindo a possibilidade de torções e consequente obstrução intestinal. Para a fixação do estoma foram utilizados filamentos monosyn 5/0 (Braun, Queluz de Baixo, Portugal), normalmente com 4 pontos simples e não contínuos. A agulha penetrou na pele cerca de 3 mm, junto com a aponevrose, passando na parede do cólon a cerca de 4 mm do topo da anastomose, por forma a deixar o topo bem aberto e com eversão da mucosa. Após estabelecimento de ambos os topos da anatomose, a cavidade abdominal foi encerrada com pontos simples e contínuos – vicryl 4/0 (Ethicon, New Jersey, EUA), para o tecido muscular e seda 4/0 (Ethicon, New Jersey, EUA) para a pele, conforme exemplificado na figura 27.

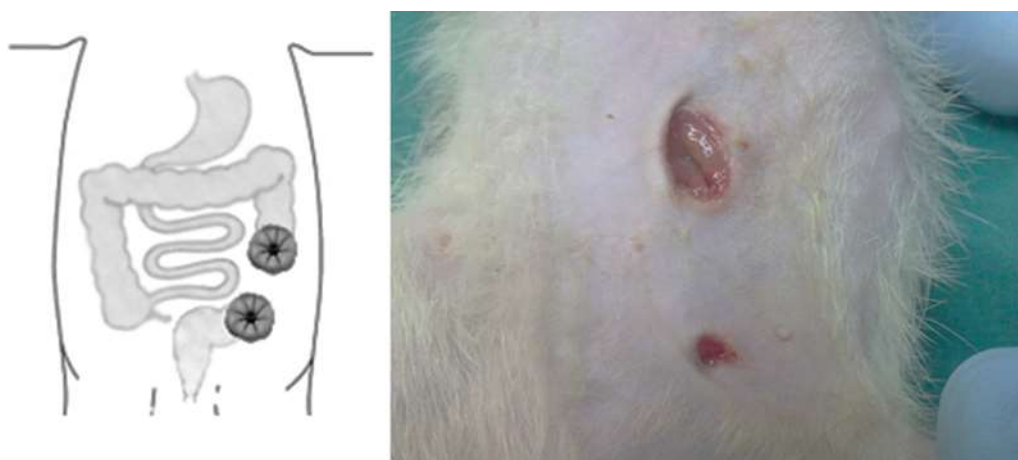


Figura 27. Representação esquemática e fotografia de colostomia descendente com fístula cutâneo-mucosa do cólon sigmoide – disponível em: Caetano-Oliveira R *et al.* Revisiting colorectal cancer animal model - An improved metastatic model for distal rectosigmoid colon carcinoma. *Pathophysiology*. 2018 Jun;25(2):89-99. doi: 10.1016/j.pathophys.2018.02.002

No que diz respeito ao procedimento cirúrgico da cecostomia, foi efetuada incisão paramedial direita com cerca de 0,5 cm de comprimento. Após abertura da cavidade abdominal foi criado um orifício circular com 0,5 cm de diâmetro com remoção de uma pequena porção de pele, aponevrose e músculo. O cego foi facilmente identificável e exteriorizado, com realização de uma pequena incisão no ápex, junto ao bordo antimesentérico, seguida de fixação do estoma com fio de sutura prolene 5/0, com recurso a seis a oito pontos simples e descontínuos, explanado na figura 28.



Figura 28. Representação esquemática e fotografia de cecostomia – disponível em: Caetano-Oliveira R *et al.* Revisiting colorectal cancer animal model - An improved metastatic model for distal rectosigmoid colon carcinoma. *Pathophysiology*. 2018 Jun;25(2):89-99. doi: 10.1016/j.pathophys.2018.02.002

Por forma a prevenir a desidratação severa e a que a recuperação animal seja rápida, as perdas hemáticas foram compensadas com uma solução salina, ratio 1:4, com 5% glicose (Braun), a 38°C, administrada via subcutânea com agulha hipodérmica 27 G.

Após os procedimentos cirúrgicos e a recuperação da consciência, os animais foram colocados em jaulas individuais com ambiente adequado. A monitorização dos animais ocorreu diariamente, com muda do fundo das jaulas duas vezes por semana, auxiliando a avaliar a função intestinal. O registo do peso foi efetuado a cada dois dias. A monitorização animal teve por alvo a deteção de sinais de stresse ou doença tais como: desidratação, apatia, indiferença, prostração, dispneia, movimento em círculos, cabeça baixa, alterações da diurese, volume fecal, perda de massa corporal e diminuição do consumo de água e/ou comida.

Durante este período, e antes da implantação ortotópica das células tumorais, o peso corporal foi monitorizado diariamente, por forma a avaliar a recuperação da cirurgia, até atingir um peso similar ao anterior à cirurgia.

As células foram implantadas quando se observou a recuperação completa, física e fisiológica dos animais. Antes da implantação cada animal foi anestesiado com isoflurano a 4% (Abbott Labs, amadora, Portugal). Os animais foram divididos em três grupos: os animais do grupo A (n=22 – 6 com cecostomia e 16 com colostomia distal) foram implantados com a linha celular WiDr; os animais do grupo B (n=21 – 6 com cecostomia e 15 com colostomia distal) foram inoculados coma linha celular C2BBe1; e os animais do grupo C (n=12 – 6 com cecostomia e 6 com colostomia distal) foram implantados com a linha celular LS1034.

Para a implantação das linhas celulares, as células tumorais foram destacadas dos seus frascos de cultura, com preparação de suspensões celulares. Por forma a

assegurar o número correto de células para implantação (1×10^7 células/animal) e para aferir a viabilidade celular, foi utilizado o teste de azul tripano. Após a preparação das suspensões celulares, o meio de cultura foi descartado e as células aspiradas com a ajuda de uma seringa de 1mL, com agulha hipodérmica 21 G no mínimo volume possível, assegurando assim um ótimo sucesso de inoculação e menor risco de derrame. Implantação foi efetuada com agulha hipodérmica 30 G, sempre que possível num único foco, na submucosa da cecostomia e colostomia distal, numa câmara de fluxo laminar.

F. Estudo necrópsico e histológico

Assim que os animais atingiam os 60 dias após cirurgia, ou quando os *endpoints* do estudo eram atingidos, os animais foram occisados, após anestesia com isoflurano a 4% (Abbott Labs, amadora, Portugal), seguido de overdose anestésica. O estudo necrópsico foi conduzido em todos os animais, com colheita do local de inoculação das células tumorais, fígado, pulmões e qualquer órgão que exibisse alterações.

Os tecidos foram fixados em formaldeído a 4% e processados durante a noite a 4°C. Posteriormente foram incluídos em blocos de parafina, com realização de cortes de 4µm de espessura e corados com H&E.

G. Avaliação imagiológica por medicina nuclear

Por forma a avaliar o sucesso da xenotransplantação, o crescimento tumoral e possíveis metástases à distância, recorreu-se a metodologia de medicina nuclear utilizando o radiofármaco ^{99m}Tc -MIBI. Para a aquisição de imagens os animais foram anestesiados conforme o procedimento descrito para a intervenção cirúrgica, com posterior injeção intravenosa do radiofármaco na veia da cauda, tendo este uma atividade de 100 ± 15 MBq (STAMICIS[®], Molecular IBA, Spain) ao final de uma, cinco e dez semanas após a implantação das linhas celulares nos animais. As imagens foram adquiridas numa câmara gama – Millennium 2010 GE-Healthcare, controlada por computador – *software* GenieAcq, e efetuadas em duas fases sequenciais. Durante a fase dinâmica as imagens foram adquiridas a cada 30 s, durante 10 min. Posteriormente foram adquiridas imagens estáticas aos 10, 30, 60, 90 e 120 min após a administração do radiofármaco. As imagens foram então transferidas para uma estação de controlo Xeleris (HP xw6400) para processamento.

3. Procedimentos gerais

A. Estudos imuno-histoquímicos

Os controlos adequados, positivos e negativos, para cada anticorpo foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante, por forma a obter a melhor intensidade de sinal. Os controlos positivos foram obtidos em sobrenadantes de espécimes cirúrgicos do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, e para os controlos negativos foi utilizada IgG não imune em substituição do anticorpo humano, de acordo com o estipulado por Hewitt *et al*⁴¹⁴. Os controlos positivos seguiram as recomendações da *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists*, no que respeita ao tempo de isquemia fria e tempos de fixação dos espécimes cirúrgicos⁴¹⁵. Este procedimento reveste-se de particular importância, pois só uma seleção criteriosa de tecidos para controlo possibilita a avaliação da especificidade e sensibilidade do processo de marcação imuno-histoquímico⁴¹⁶. No Serviço de Anatomia Patológica do CHUC os controlos estão disponíveis em bloco multitecidos, construído como os controlos supramencionados e de acordo com a metodologia preconizada por Kononen *et al*⁴¹⁷. Os tecidos foram re-incluídos num bloco recetor de parafina, dispostos numa matriz específica e, antes da sua utilização, seccionados e corados com coloração de H&E por forma a aferir a sua representatividade, integridade e qualidade morfológica⁴¹⁸.

Os tecidos foram cortados em secções de 4 µm de espessura num micrótomo rotativo semiautomatizado de tipo Minot, Leica Biosystems RM2245, sendo colocados em lâminas Superfrost Plus (Thermo Scientific, Oeiras, Portugal) – tecido de interesse na região central e respetivos controlos no terço inferior da lâmina. Os cortes histológicos foram colocados em estufa (Memmerth UFE500) a 60°C, durante 35 min, por forma a facilitar o processo de adesão à lâmina.

Os tecidos foram posteriormente sujeitos a um processo de desparafinização em xilol (VWR, Radnor, EUA) e hidratação, recorrendo a soluções de etanol com concentrações progressivamente decrescentes.

A fixação em formol induz ligações cruzadas em diversos antigénios, incluindo os de interesse. A recuperação antigénica foi efetuada com imersão das lâminas em solução tampão EDTA-Tris, (CC1, Ventana Medical Systems, Arizona, EUA), à temperatura de 95°C, com pH 8, e durante 8 min, num módulo de pré-tratamento específico – *PT Link* (Dako, Glostrup, Dinamarca). Seguiu-se um período de arrefecimento gradual – 20 min – até obtenção de uma temperatura de 60°C. As lâminas foram lavadas com água destilada e as ligações inespecíficas e indesejadas foram bloqueadas com solução hiperproteica tamponada durante 4 min – Antibody Diluent (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA). As lâminas foram finalmente incubadas com os anticorpos primários e lavadas com PBS.

A caracterização imuno-histoquímica foi efetuada numa plataforma Ventana Marker Platform Bench Mark ULTRA IHC/ISH, com recurso a um sistema de deteção

multimérico indireto, livre de biotina – *Optiview DAB IHC Detection Kit* (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA), com temperatura otimizada em 36°C.

A inibição da peroxidase endógena foi efetuada à custa de *OptiView Peroxidase Inhibitor* (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA) – uma solução de H₂O₂ a 3% em tampão fosfato, durante 10 min. A detecção dos antígenos baseia-se num cocktail de anticorpos secundários IgG e IgM (cabra anti-ratinho e anti-coelho) – *OptiView HQ Universal Linker* (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA), conjugados com um hapteno não endógeno 3-hidroxi-2-quinoxalina, durante 12 min. As lâminas foram posteriormente lavadas com PBS – *Reaction Buffer* (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA), sendo utilizado o sistema de detecção suprarreferido, num período de 8 min. O anticorpo primário foi revelado após a incubação das lâminas com 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) a 0,2 % e com H₂O₂ a 0,04% – *OptiView H2O2* (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA) durante 8 min, através de uma coloração castanha, intensificada pela adição de sulfato de cobre a 5 %, *OptiView Copper* (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA) durante 4 min. As amostras foram posteriormente contrastadas com hematoxilina (Ventana Medical Systems, Arizona, EUA) e com carbonato de lítio (numa concentração de 0,1 M, Ventana Medical Systems, Arizona, EUA) e carbonato de sódio (numa concentração de 0,5 M, Ventana Medical Systems, Arizona, EUA), dando uma tonalidade azulada à lâmina. Finalmente as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas com xilol e preservadas com meio sintético específico – *Quick-D mounting medium* (Klinipath, Breda, Netherland).

Os anticorpos utilizados nas diversas tarefas, e suas características, podem ser consultados na tabela 5.

Tabela 5. Características dos anticorpos utilizados nas diversas tarefas. P53 – proteína 53; CK20 – citoqueratina 20; CDX2 - *Homeobox protein CDX-2*; CD44 – *cluster of differentiation 44*; CD133 – *cluster of differentiation 133*; CEA – antígeno carcinoembrionário; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; MLH1 – homólogo 1 do MutL; MSH2 – homólogo 2 da proteína MutS; - homólogo 6 da proteína MutS; PMS2 – homólogo 2 do PMS1; CD68 – *cluster of differentiation 68*; PD-L1 – ligando de morte programada 1; HER-2 – Recetor 2 do fator de crescimento epidermoide humano; ALDH1 – *Aldehyde dehydrogenase 1*.

Antígeno	Clone	Diluição	Recuperação antigénica	Fonte
P53	DO-7	1:50	Ultra CC1	Dako
CK20	KS20.8	1:50	Ultra CC1	Thermo Scientific
CDX2	AMT 28	1:50	Ultra CC1	Leica
Ki67	MIB-1	1:50	Ultra CC1	Dako
Vimentina	V9	1:50	Ultra CC1	Ventana
CD44	SP37	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
CD133	17A6.1	1:100	Ultra CC1	Millipore
E-caderina	NCH-38	1:50	Ultra CC1	Dako
β-catenina	Clone 14	Pronto a usar	Ultra CC1	CellMarque
CEA	CEA31	Pronto a usar	Ultra CC1	CellMarque
VEGF	VG1	1:50	Ultra CC1	Dako
MLH1	M1	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
MSH2	G219-1129	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
MSH6	44	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
PMS2	EPR3947	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
CD68	KP-1	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
PD-L1	22C3	1:40	Ultra CC1	Dako
HER-2	4B5	Pronto a usar	Ultra CC1	Ventana
ALDH1	EP1933Y	Pronto a usar	Ultra CC1	Abcam

B. Visualização microscópica e aquisição de imagens

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

4. Análise estatística

4.1. Estudo clínico

Nesta tarefa o estudo estatístico foi efetuado com recurso ao *software* SPSS™, versão 21.0 para Windows (Chicago, EUA).

Os dados quantitativos estão expressos em média±desvio padrão e *range* quando apresentam distribuição normal, com expressão em mediana±desvio padrão e *range* quando não se verificou distribuição normal. A distribuição normal foi avaliada de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

As variáveis contínuas em análise foram avaliadas utilizando o teste t de Student e variáveis categóricas foram analisadas com recurso ao teste do Chi-quadrado.

Quando efetuados testes de associação, estes foram realizados de acordo com o teste de Friedman, teste de *log-rank*, coeficiente de correlação de Spearman e análise de variância (ANOVA).

As curvas de sobrevivência foram delineadas com o método de Kaplan-Meier e comparadas com o teste de *log-rank*. As variáveis selecionadas pela análise de Kaplan-Meier foram posteriormente incorporadas em estudo multivariado executado com o modelo de regressão de Cox, com definição da taxa de risco (HR, do inglês *Hazard Ratio*) e intervalo de confiança (CI, do inglês *confidence interval*) a 95%. O HR está associado a uma variável em estudo, indicando se a mesma está associada a um risco maior ou menor de um determinado evento, sendo esse evento definido como morte ou recidiva tumoral. O seu cálculo foi efetuado com base no quociente entre o risco de ocorrer determinado evento num grupo A (por exemplo morte) e o risco de ocorrer esse evento num grupo B. O HR é também denominado de risco relativo, por causa dessa associação, pois permite a comparação do risco de um evento ocorrer em dois grupos. Se o HR for superior a um, o risco no grupo A é superior.

Para efeitos de sobrevivência global (OS), esta foi definida como o espaço de tempo entre a cirurgia colorretal (no componente de carcinoma colorretal e microambiente) e hepatectomia (no componente de hepatectomia por metástases hepáticas de carcinoma colorretal e gástrico) e a morte do doente ou o último registo de vida.

A recorrência tumoral foi definida como lesão ou lesões malignas detetadas por métodos imagiológicos/patológicos ou aumento dos valores dos marcadores tumorais séricos.

A sobrevivência livre de doença (DFS) foi definida como o tempo de intervalo entre a hepatectomia e a recorrência tumoral ou morte do doente.

Para os exames supracitados foi definido significado estatístico para $p < 0,05$.

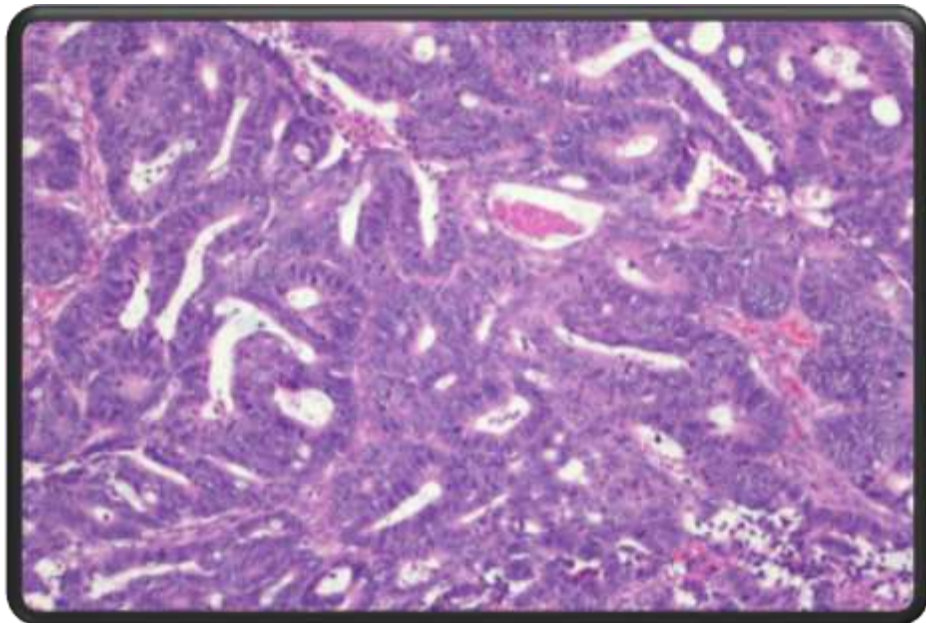
4.2. Estudo pré-clínico

No que diz respeito ao estudo pré-clínico, os achados referentes ao modelo animal e para cada linha tumoral utilizada, nomeadamente a sobrevivência global aos 60 dias, a incidência tumoral, a invasão neural e a doença metastática foram analisados de forma descritiva e estão expressos em percentagem.

Para avaliação dos testes de citotoxicidade, os dados obtidos foram analisados com testes não paramétricos com recurso a *software* GraphPad Prism version 5.0f, Mac OS X (GraphPad Software, La Jolla California EUA).

Capítulo V

Resultados



Conforme detalhado no material e métodos, o estudo pré-clínico versou então a caracterização do microambiente tumoral em doentes com CRC em situação de imunossupressão específica, nomeadamente por transplante hepático e/ou renal.

Foi ainda avaliado o microambiente das metástases hepáticas, mais concretamente sob a forma dos padrões de crescimento histológicos, fenótipo tradutor de uma relação específica tumor/parênquima não tumoral, quer no que concerne a metástases de carcinoma colorretal, quer em metástases de carcinoma gástrico, estabelecendo impacto prognóstico.

O modelo animal ortotópico de CRC foi realizado com o intuito de recriar esses resultados e possibilitar a translação de conhecimento para o mecanismo humano de doença.

1. Estudo clínico

1.1 Carcinoma colorretal e microambiente

A. Amostra em estudo

Coorte dos doentes submetidos a transplante hepático

Foram isolados cinco doentes, previamente submetidos a transplante hepático (janeiro 1992 – dezembro 2016), num total de 755 doentes submetidos a transplante hepático neste período de tempo, perfazendo uma incidência de 1:151, todos do género masculino, com idade média de $53,4 \pm 8,08$ anos aquando do transplante (*range* 43-62). Quatro (83,3%) apresentavam cirrose de etiologia alcoólica; o doente restante (17,7%) apresentava cirrose biliar secundária por colangite biliar primária. Um dos doentes com cirrose alcoólica tinha um carcinoma hepatocelular (CHC) bem diferenciado, G1, com 2 cm e sem invasão vascular (pTNM – T1) e outro tinha um nódulo necrótico, sem evidência de neoplasia nem história prévia de tratamento. O doente com colangite biliar primária apresentava também um historial de colite ulcerosa, sem sinais de displasia em estudos endoscópicos prévios e comprovados por biópsia. Ressalva-se que o doente com CHC foi submetido a transplante renal oito meses após transplante hepático, por falência renal idiopática. Todos os doadores eram ABO compatíveis, com mediana de idades de $50 \pm 8,23$ anos (*range* 44-65), três do género masculino e dois do género feminino. Todos os doentes cumpriram regime de imunossupressão com prednisolona, tacrolimus, everolimus e micofenolato de mofetil.

O diagnóstico de CRC ocorreu após uma mediana de $55,2 \pm 26,13$ meses (*range* 16-77) após o transplante hepático, tendo os doentes aquando do diagnóstico uma mediana de $58 \pm 10,19$ anos (*range* 44-69). No que diz respeito à sobrevivência global (OS) os doentes apresentaram uma mediana de $28 \pm 9,86$ meses, com dois doentes falecidos nos primeiros dois meses, conforme exemplificado na figura 29.

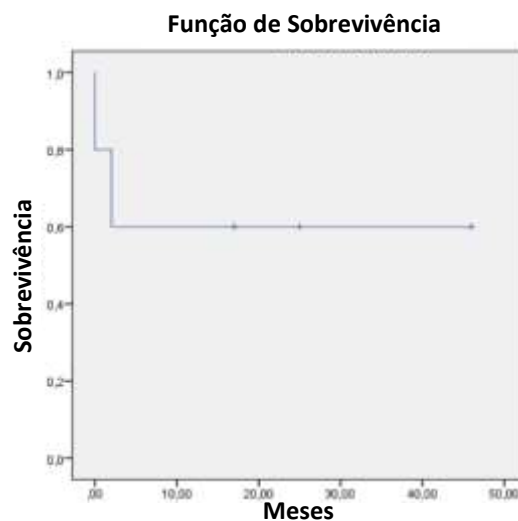


Figura 29. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a coorte de transplante hepático.

Coorte dos doentes submetidos a transplante renal

Sete doentes, previamente submetidos a transplante renal (janeiro 1992 – dezembro 2016), num total de 2662 intervenções, traduzindo uma incidência de 1:380, cinco do género masculino (71,4%) e dois do género feminino (28,6%), com média de idade aquando da transplantação de 52,75±17,57 anos (*range* 24-70). Nenhum dos doentes tinha hábitos alcoólicos ou tabágicos. No que diz respeito a comorbilidades, cinco doentes apresentavam dislipidemia; um deles exibia concomitantemente hipertensão arterial. Um doente tinha diabetes *mellitus*. Todos fizeram diálise antes do transplante renal durante uma mediana de 45,43±25,55 meses (*range* 9-84).

No que diz respeito à etiologia da falência renal, em dois doentes resultou de glomerulonefrites crónicas, dois de doença renal poliquística e um dos doentes realizou transplante por nefrotoxicidade; dois doentes tinham falência renal de causa indeterminada. Todos os rins transplantados foram provenientes de dadores do género masculino, ABO compatíveis, com mediana de idades de 43,71±17,59 anos (*range* 27-57).

Todos os doentes estiveram sob imunossupressão durante uma mediana de 10,86±6,37 meses (*range* 2-17), com uma combinação de pelo menos três fármacos. Todos os doentes fizeram prednisolona e dois doentes estiveram também sob terapêutica com azatioprina e ciclosporina A. Para além destes fármacos imunossupressores outros foram utilizados como a rapamicina (um doente), tacrolimus (quatro doentes), micofenolato de mofetil (dois doentes) e globulina antitímócito (um doente).

Nenhum doente teve infeção por vírus Epstein Barr (EBV) e cinco tiveram infeção por citomegalovírus (CMV). Apenas em dois doentes se verificaram episódios de rejeição aguda e em apenas um doente se observou rejeição crónica.

O diagnóstico de CRC ocorreu após uma mediana de 117,85±76,97 meses (*range* 14-197) após transplante renal, tendo os doentes nesse momento uma mediana de 61,43±16,65 anos (*range* 34-78). Os tumores exibiram uma prevalência no cólon direito quando comparados com o cólon esquerdo (4:3).

Relativamente à OS, todos os doentes faleceram, com uma sobrevivência mediana de 135,28±67,74 meses (*range* 36-204) após o transplante renal e 117,86±76,98 meses (*range* 14-197) após o diagnóstico de CRC, como é possível observar na figura 30.

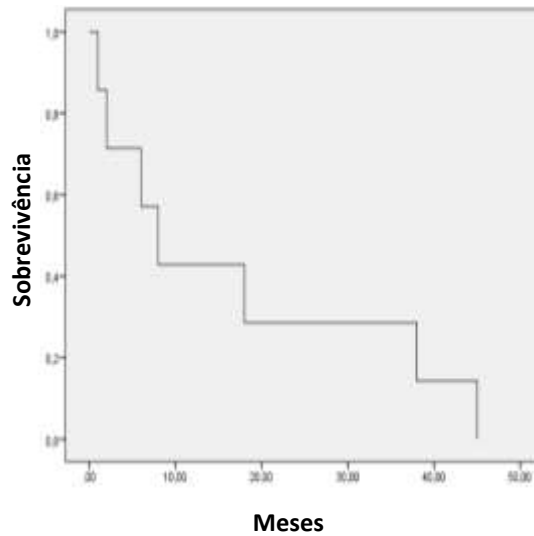


Figura 30. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a coorte de transplante renal.

B. Estudo histológico

Nos doentes submetidos a transplante hepático, o CRC estava localizado no cólon direito em dois doentes e no cólon esquerdo em três, tendo quatro doentes sido submetidos a cirurgia. Ao estudo macroscópico, dois tumores eram ulcerados e dois eram circunferenciais e estenosantes.

No que diz respeito à densidade do infiltrado inflamatório associado, em dois CRC o infiltrado inflamatório era de baixa densidade, e quanto à sua composição esses tumores exibiam baixo número/ausência de eosinófilos. Em duas das neoplasias eram evidentes extensas áreas de necrose.

Na coorte dos doentes com CRC após transplante hepático, dois doentes estavam em estádios avançados de doença (Estádio III/IV).

Quando avaliado o seu padrão de crescimento, três CRC revelaram padrão de crescimento de tipo infiltrativo e um de tipo expansivo, representados na figura 31.

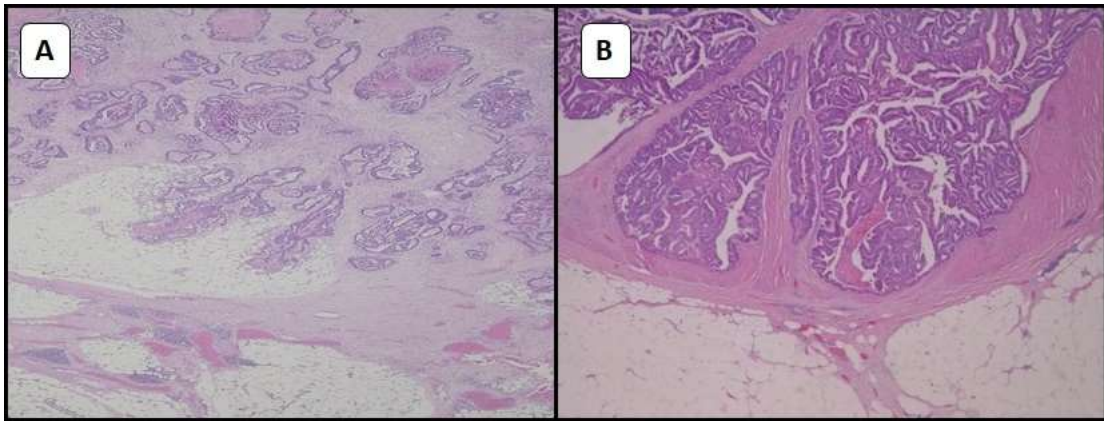


Figura 31. Crescimento tumoral de tipo infiltrativo, com “linguetas tumorais” que envolvem o tecido adjacente, H&E 20x (A); Crescimento tumoral de tipo expansivo, com compressão do tecido adjacente, H&E 20x (B).

Dos doentes que desenvolveram CRC após transplante renal, seis doentes foram submetidos a cirurgia. Ao estudo macroscópico, quatro tumores eram ulcerados e dois eram circunferenciais e estenosantes.

Ao estudo histológico todos os CRC revelaram um padrão de crescimento de tipo infiltrativo e cinco dos doentes estavam em estádios avançados de doença (Estádio III/IV). Quando analisada a densidade do infiltrado inflamatório, foi evidente uma baixa densidade em três dos doentes e, quando analisada a composição do mesmo, todos os tumores exibiam baixo número/ausência de eosinófilos.

Três tinham infiltrado inflamatório de baixa densidade associado, e todos os cinco CRC exibiam extensas áreas de necrose (figura 32).

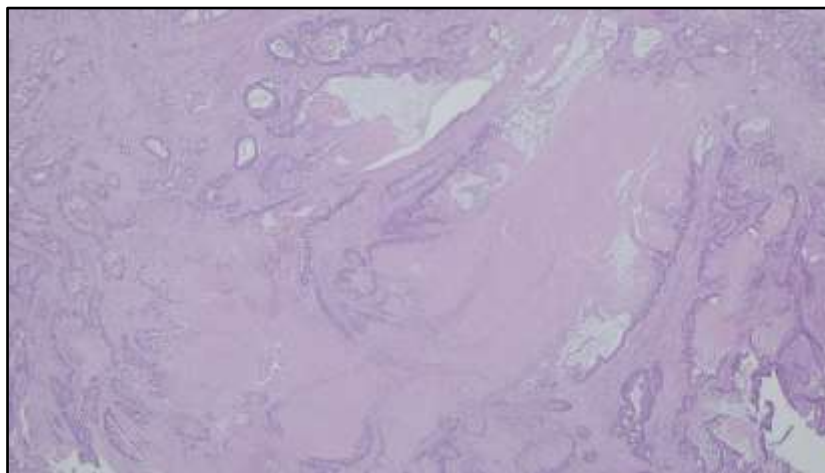


Figura 32. Carcinoma colorretal com extensa necrose intratumoral, indicador de crescimento rápido e agressivo, H&E 20x.

Não se obteve diferença estatística entre a mediana de idades dos doentes aquando do diagnóstico de CRC, nem entre a mediana de tempo entre o transplante e a deteção do CRC nos dois grupos ($p=0,182$).

No que diz respeito ao subtipo histológico, todos os tumores de ambas as coortes correspondiam a adenocarcinomas de baixo grau, três deles com áreas de produção de muco – correspondendo a menos de 50% do volume tumoral. Três em dez tumores não registaram invasão linfovascular; os seis restantes tinham uma média de $4,67\pm 4,03$ gânglios linfáticos positivos (*range* 1-11).

As características clínicas e patológicas de ambas as coortes podem ser consultadas na tabela 6.

Tabela 6. Dados clínicos e patológicos dos doentes das coortes de transplantes hepático e renal.
*parâmetros avaliados apenas nos doentes submetidos a cirurgia.

	Coorte de transplantação hepática	Coorte de transplantação renal
Número de doentes	N = 5	N=7
Média de idade aquando do transplante ± desvio padrão (anos)	53,4±8,08	52,75±17,57
Género		
Masculino	5	5
Feminino		2
História prévia de colite ulcerosa		
Não	4	-
Sim	1	
Mediana de tempo de desenvolvimento de carcinoma colorretal após transplante ± desvio padrão (meses)	55±10,19	117,85±76,97
Mediana de idade do diagnóstico de carcinoma colorretal ± desvio padrão (anos)	55,2±26,13	61,43±16,65
Localização do tumor		
Cólon direito	2	3
Cólon esquerdo	3	4
Número de doentes submetidos a cirurgia de carcinoma colorretal	4	6
Estádio tumoral (AJCC)*		
Estádio II	2	1
Estádio III/IV	2	5
Padrão de crescimento*		
Infiltrativo	3	6
Expansivo	1	0
Metástases linfáticas*		
Não	2	2
Sim	2	4
Infiltrado inflamatório*		
Baixo grau	2	3
Alto grau	2	3
Número de eosinófilos*		
Baixo/Ausente	2	6
Intermédio/Alto	2	0
Necrose*		
Focal/Intermédia	2	1
Alta	2	5
Instabilidade de microssatélites		
Instável	2	2
Estável	3	5
Status TP53		
Wild type	2	4
Mutado	3	3
Expressão de cancer stem cells		
CD44	3	4
ALDH1	4	5
CD133	5	7
Presença de células Natural Killer*		
Negativo	4	6
Positivo	0	0
Expressão de PD-L1		
Negativo	5	7
Positivo	0	0
Status KRAS		
Wild-type	2	5
Mutado	3	2

No que diz respeito ao estudo imuno-histoquímico e genético os resultados foram os seguintes:

a) *Instabilidade de microssatélites*

O estudo da instabilidade de microssatélites (MSI) revelou perda de expressão para as proteínas de reparação do DNA em dois doentes da coorte de transplantação hepática (33,3%) e em dois doentes da coorte de transplantação renal (28,6%). Dois doentes revelaram perda isolada de MSH6 e um doente exibiu perda de MSH2 e MSH6, conforme se exhibe na figura 33A.

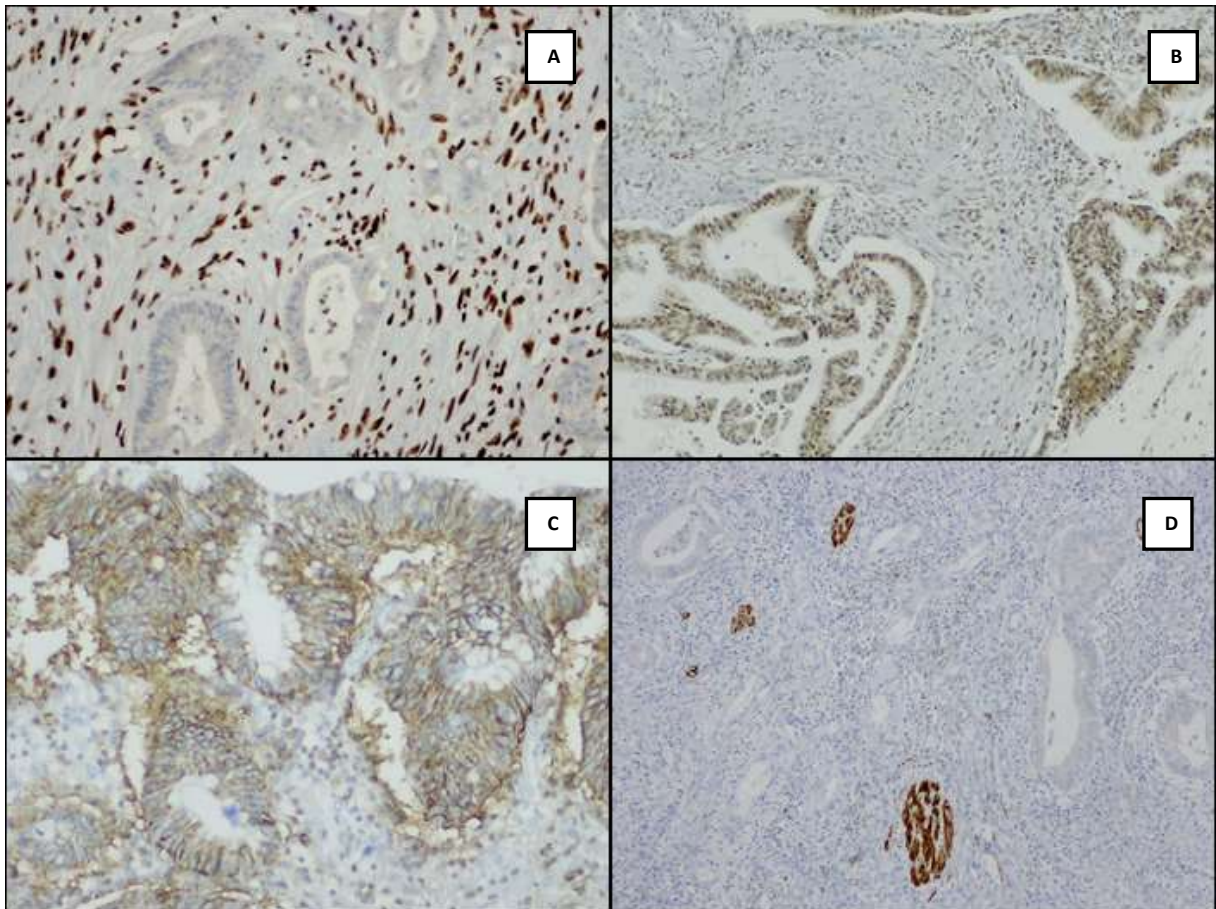


Figura 33. Estudos imuno-histoquímicos: A – perda de expressão para MSH2 nas células tumorais, com positividade nos linfócitos (controlo interno), 100x; B – sobre-expressão para P53 na maioria das células tumorais, 100x; C – elevada expressão de CD44 nas células tumorais, sob a forma de padrão membranar, 200x; D – ausência de células NK no infiltrado inflamatório intra tumoral, avaliada com anticorpo anti-CD56, com positividade nas fibras neurais aprisionadas (controlo interno), 100x.

b) *Status TP53*

A avaliação de mutações *TP53*, por via de estudo imuno-histoquímico, foi detetada em três doentes (60%) da coorte de transplantação hepática e em três doentes (42,9%) da coorte de transplantação renal. Um exemplo da sobre-expressão de P53 pode ser visto na figura 33B.

c) *Expressão de cancer stem cells*

Nos dois grupos identificou-se elevada expressão de marcadores de *cancer stem cells*. Todos os tumores expressavam CD133, elevada expressão de CD44, como exemplificado na figura 33C, em 60% e 57,1%, e expressão de ALDH1 em 80% e 71,4%, na coorte de transplantação hepática e renal, respetivamente.

d) *Avaliação de células NK e expressão de PD-L1*

Em todos os tumores não foram identificadas células NK (positivas para CD56), com os respetivos controlos extrínsecos e intrínsecos (componente neural) positivos, com representação na figura 33D.

No que diz respeito à expressão de PD-L1, não se obteve expressão nas células tumorais em nenhum dos CRC – score 0.

e) *Avaliação da mutação KRAS*

O estudo genético revelou mutação no gene *KRAS* em três doentes (60%) na coorte de transplantação hepática e em dois doentes (28,6%) na coorte de transplantação renal. Nos doentes sem mutação *KRAS* identificada, o estudo genético incluiu pesquisa *NRAS* e *BRAF*, que foi negativa.

O estudo imuno-histoquímico e genético, conjuntamente com as características clínicas e patológicas podem ser consultadas na tabela 6.

1.2 Metástases hepáticas de carcinoma do cólon

A. Amostra em estudo

Após uma mediana de 31,7 meses (*range* 0-72) de *follow-up*, 74 doentes (67%) desenvolveram recidiva tumoral, estando os restantes 36 doentes (33%) livres de recorrência neoplásica. A mediana de OS após hepatectomia por metástase hepática de CRC (CRCLM) foi de 52 meses, com OS de 68,5% e 47,5% aos 3 e 5 anos, respetivamente. A sobrevivência livre de doença (DFS) foi, respetivamente, de 29,9% e 21,7% aos 3 e 5 anos. Quarenta doentes (36%) morreram de doença, 29 dos quais (73%) por recorrência intra-hepática e 9 (23%) por recorrência à distância. À data do último *follow-up* 48 doentes estavam vivos, 27 dos quais (56%) com registo de recidiva neoplásica e 21 (44%) sem evidência de doença. Recorrência intra-hepática foi identificada em 48 doentes (44%) e em outras localizações em 24 doentes (22%).

As curvas de sobrevivência global e de sobrevivência livre de doença estão representadas na figura 34.

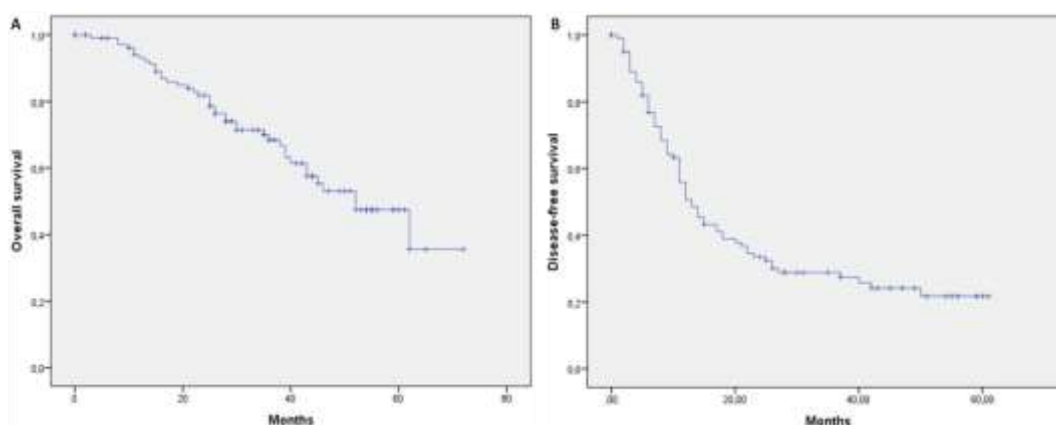


Figura 34. Curvas de Kaplan-Meier referentes à sobrevivência global (A) e à sobrevivência livre de doença (B).

B. Quimioterapia neoadjuvante (NAC)

O uso de quimioterapia neoadjuvante não se associou a pior sobrevivência global ($p=9,395$), mas a sobrevivência livre de doença foi menor no grupo submetido a NAC (9 vs. 23 meses, $p<0,001$), quando comparado com o grupo submetido apenas a cirurgia, conforme se demonstra na figura 35.

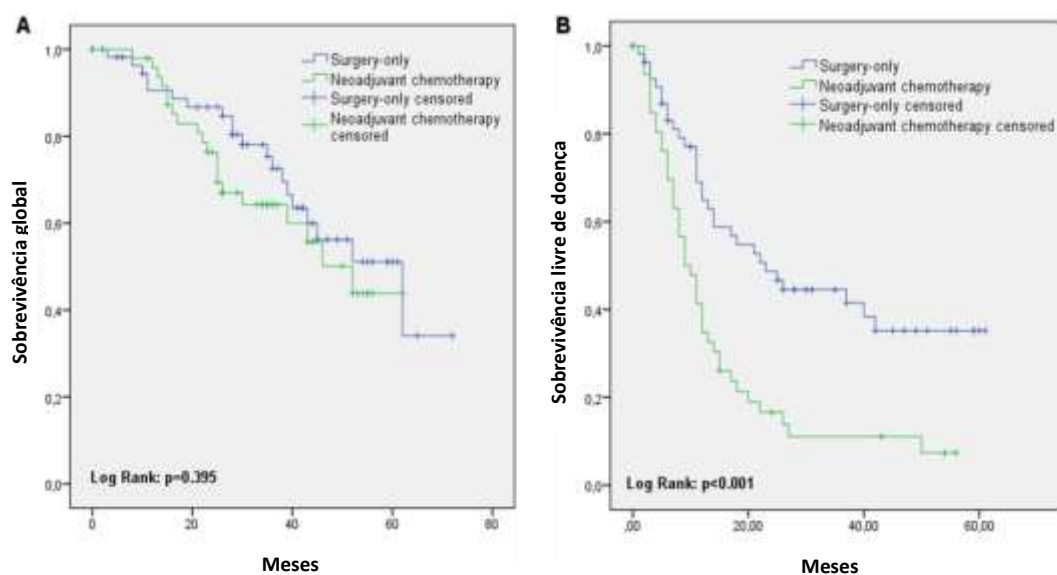


Figura 35. Curvas de Kaplan-Meier comparando a sobrevivência global (A) e a sobrevivência livre de doença (B) entre o grupo submetido apenas a cirurgia e o grupo submetido a quimioterapia neoadjuvante. É possível observar uma diferença estatisticamente significativa na sobrevivência livre de doença ($p < 0.001$) com menor sobrevivência no grupo submetido a quimioterapia neoadjuvante.

Esta diferença não foi significativa para a sobrevivência livre de recorrência hepática ($p = 0,179$).

Uma comparação entre os dois grupos, um grupo submetido a QTNA e cirurgia e outro grupo apenas a cirurgia, revela que os doentes do grupo submetido a quimioterapia neoadjuvante tinham mais frequentemente apresentação síncrona (71,9% vs. 28,1% $p < 0,001$), múltiplas metástases hepáticas (63,5% vs. 36,5%, $p < 0,001$), distribuição bilobar (63,4% vs. 36,6%, $p = 0,009$) e foram submetidos mais frequentemente a ressecção síncrona do tumor primário e das metástases hepáticas (19,2% vs. 3,4%, $p = 0,008$).

Estes achados estão refletidos na tabela 7.

Tabela 7. Comparação das características clínicas entre o grupo de doentes submetido a quimioterapia neoadjuvante e cirurgia e o grupo de doentes sujeito apenas a cirurgia. QTNA – quimioterapia neoadjuvante.

Parâmetros	Grupo QTNA (n =52)	Grupo cirúrgico (n = 58)	Valor de p
Idade dos doentes (anos)	62,13 ± 9,21	64,50 ± 10,94	0,226
Localização do tumor primário			
Cólon (%)	32 (61,5)	41 (70,7)	0,156
Reto (%)	19 (36,5)	13 (22,4)	
Cólon e Reto (%)	1 (1,9)	4 (6,9)	
Gânglios linfáticos positivos (%)	37 (71,2)	38 (65,5)	0,513
Gânglios linfáticos negativos (%)	15 (28,8)	20 (34,5)	
Apresentação síncrona (%)	41 (78,8)	16 (27,6)	< 0,001
Apresentação metácrona (%)	11 (21,2)	42 (72,4)	
Metástase única (%)	12 (23,1)	35 (60,3)	<0,001
Múltiplas metástases (%)	40 (76,9)	23 (39,7)	
Mediana do maior diâmetro da metástase hepática (range)	47,84 ± 38,99	37,93 ± 22,52	0,118
Distribuição unilobar (%)	26 (50)	43 (74,1)	0,009
Distribuição bilobar (%)	26 (50)	15 (25,9)	
Ressecção síncrona (%)	10 (19,2)	2 (3,4)	0,008
Ressecção metácrona (%)	42 (80,8)	56 (96,9)	
Hepatectomia <i>minor</i> (%)	29 (55,8)	41 (70,7)	0,104
Hepatectomia <i>major</i> (%)	23 (44,2)	17 (29,3)	

C. Análise histológica

Observou-se uma ressecção tumoral completa (R0) em sessenta e cinco doentes (59,1%) e em 45 doentes uma margem cirúrgica positiva (R1 ou R2). A maioria dos doentes registaram resposta patológica à NAC (TRG1-4), mas em apenas 4 (4%) dos doentes se observou resposta patológica completa (TRG1). A espessura tumoral na interface tumor-parênquima hepático (TTNI) foi superior a 0,5 mm em 68 doentes (61,8%).

Relativamente ao padrão de crescimento tumoral, o mais frequente foi o expansivo (30%), seguido do padrão desmoplásico (21%), sendo o infiltrativo o menos frequente (18%).

A percentagem de CRCLM a exibir resposta histológica foi significativamente superior em doentes submetidos a NAC do que nos doentes apenas submetidos a intervenção cirúrgica (HR 1,667, 95% CI 1,043-2,663, p=0,022). No grupo dos doentes

tratados com FOLFOX registou-se uma predominância do padrão expansivo (HR 2,438, 95% CI 1,087-5,470, p=0,031).

Na análise univariada os seguintes fatores foram preditores de pior sobrevivência global: idade superior ou igual a 70 anos (HR 5,520, p=0,019), metástase ganglionar linfática aquando da ressecção do tumor primário (HR 5,746, p=0,017), metástase hepática maior com diâmetro máximo superior ou igual a 3 cm (HR 4,578, p=0,032) e morbilidade *major* (HR 4,516, p=0,034).

Estes resultados estão resumidos na tabela 8.

Tabela 8. Características clínicas e patológicas com impacto na sobrevivência global, mais concretamente associadas a pior sobrevivência global. HR – Hazard Ratio.

Características	Número de doentes (%)	Sobrevivência global	
		Valor de p	HR
Idade (anos)			
≥ 70	77 (70)	0,019	5,520
< 70	33 (30)		
Status ganglionar linfático			
Positivo	73 (66,4)	0,017	5,746
Negativo	37 (33,6)		
Número de metástases hepáticas			
Múltiplas	63 (57,3)	0,007	7,365
Única	47 (42,7)		
Maior diâmetro da metástase hepática (cm)			
≥ 3	62 (56,4)	0,032	4,578
< 3	48 (43,6)		
Complicações pós-operatórias			
Morbilidade <i>major</i>	9 (8,2)	0,034	4,516
Morbilidade <i>minor</i>	97 (88,2)		
Padrão de crescimento expansivo da metástase hepática			
Sim	33 (30)	0,014	6,029
Não	77 (70)		

No que diz respeito a fatores associados a menor sobrevivência livre de doença, a presença de múltiplas metástases hepáticas (HR 17,049, p<0,001), apresentação síncrona de CRC e CRCLM (HR 9,982, p=0,002), lesões metastáticas com distribuição bilobar (HR 8,082, p=0,004), ressecção hepática *major* (HR 4,294, p=0,038) e morbilidade pós-operatória *major* (HR 4,170, p=0,041) foram associadas a menor sobrevivência livre de doença.

No que respeita à sobrevivência livre de recorrência hepática, esta foi influenciada negativamente por diagnóstico síncrono de CRC e CRCLM (HR 5,850, p=0,016) e por metástases hepáticas com distribuição bilobar (HR 6,041, p=0,014).

Estes fatores com influência na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência livre de recorrência hepática estão expostos na tabela 9.

Tabela 9. Fatores clínicos e patológicos com influência na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência livre de recorrência hepática. HR – *Hazard Ratio*. CRCLM – metástases hepáticas de carcinoma colorretal.

Características	Número de doentes (%)	Sobrevivência livre de doença		Sobrevivência livre de recorrência hepática	
		Valor de p	HR	Valor de p	HR
Apresentação das CRCLM					
Síncronas	57 (51,8)	0,002	9,982	0,016	5,850
Metácronas	53 (48,2)				
Número de metástases					
Múltiplas	63 (57,3)	< 0,001	17,049	0,126	-
Solitária	47 (42,7)				
Distribuição das CRCLM					
Bilobar	41 (37,3)	0,004	8,082	0,014	6,041
Unilobar	69 (62,7)				
Quimioterapia neoadjuvante					
Sim	52 (47,3)	< 0,001	13,767	0,179	-
Não	58 (52,7)				
Hepatectomia					
Major	40 (36,4)	0,038	4,294	0,838	-
Minor	70 (63,6)				
Complicações pós-operatórias					
Morbilidade major	9 (8,2)	0,041	4,170	0,719	-
Morbilidade minor	97 (88,2)				
Margem cirúrgica hepática					
Positiva	65 (59,1)	0,029	4,776	0,584	-
Negativa	45 (40,9)				
Padrão de crescimento expansivo da metástase hepática					
Sim	33 (30)	0,004	8,274	0,296	-
Não	77 (70)				
Padrão de crescimento desmoplásico da metástase hepática					
Sim	23 (20,9)	0,012	6,310	0,891	-
Não	87 (79,1)				

A margem de ressecção cirúrgica livre de neoplasia não teve impacto significativo na OS quando comparada com os doentes com margem cirúrgica positiva (HR 2,093, p=0,148), no entanto os doentes com margem cirúrgica positiva exibiram uma diminuição significativa da DFS (HR 4,774, p=0,029). Não se obteve diferenças entre recidiva intra e extra-hepática nos dois grupos (p=0,584).

A regressão patológica do tumor não teve associação significativa com OS ($p=0,144$), DFS ($p=0,488$) ou sobrevivência livre de recorrência hepática ($p=0,158$) como é possível observar na figura 36.

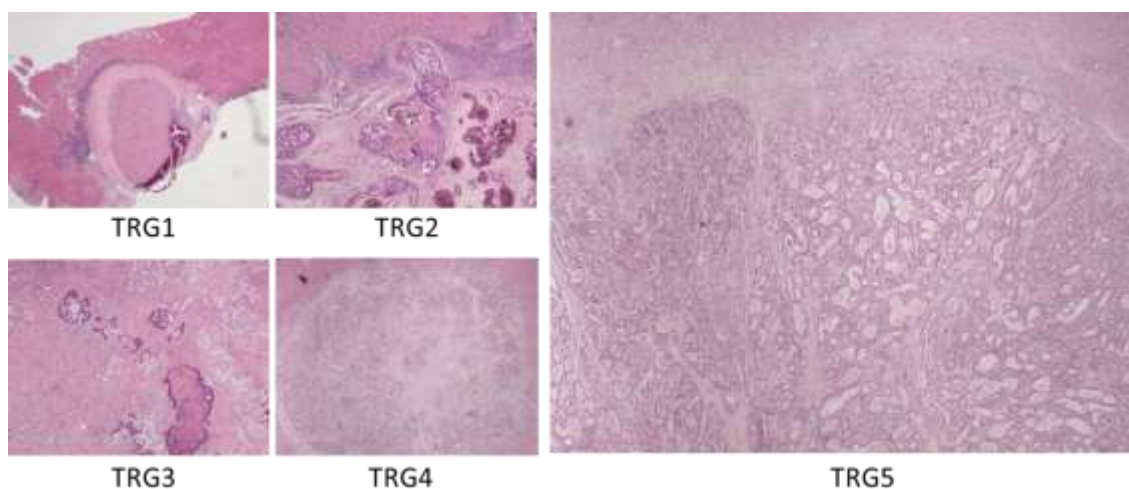


Figura 36. Diversos graus de regressão tumoral patológicos (TRG), das metástases hepáticas de carcinoma colorretal. TRG 1 corresponde à ausência de tumor residual, com fibrose abundante; TRG 2 corresponde a escasso tumor viável, num estroma com abundante fibrose; TRG 3 a tumor residual mais viável num estroma predominantemente fibroso; TRG 4 to tumor residual extensamente viável, predominando sobre a fibrose; TRG 5 a tumor extensamente viável com rara fibrose. Imagem disponível em: Falcão D. *et al.* Histopathologic patterns as markers of prognosis in patients undergoing hepatectomy for colorectal cancer liver metastases: Pushing growth as an independent risk factor for decreased survival. *Eur. J. Surg. Oncol.* (2018). doi:10.1016/j.ejso.2018.03.023.

Quando avaliada a determinação do TTNI, a mesma não revelou impacto na sobrevivência global ($p=0,463$) e na sobrevivência livre de recorrência hepática ($p=0,375$) para doentes com TTNI superior ou igual a 0,5 mm.

Quando avaliado o impacto do TTNI na sobrevivência livre de doença verificou-se que esta era inferior em doentes com TTNI superior ou igual a 0,5 mm, mas sem significado estatístico ($p=0,086$), conforme se pode verificar na figura 37.

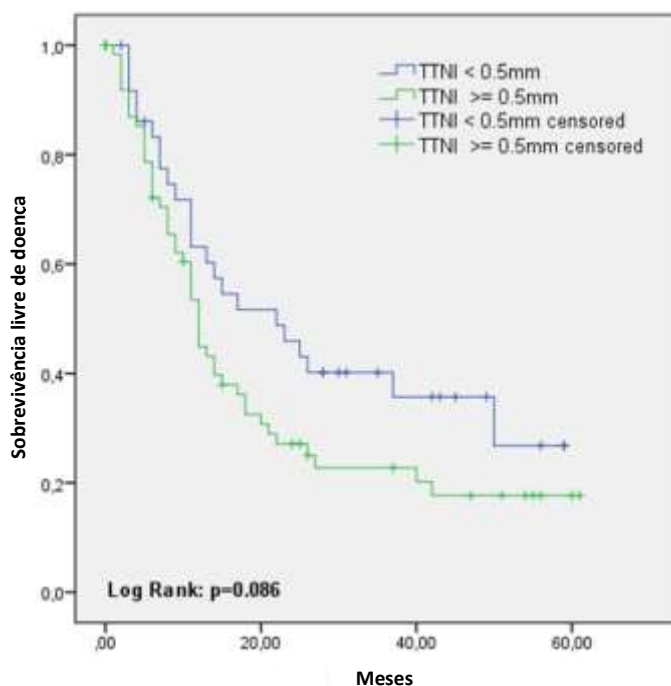


Figura 37. Curvas de Kaplan-Meier referentes à sobrevivência livre de doença das metástases hepáticas de carcinoma colorretal com a espessura do tumor na interface com o parênquima não tumoral (TTNI) nos grupos com espessura inferior a 0,5 mm e igual ou superior a 0,5 mm.

Duas representações da medição do TTNI podem ser vistas na figura 38.

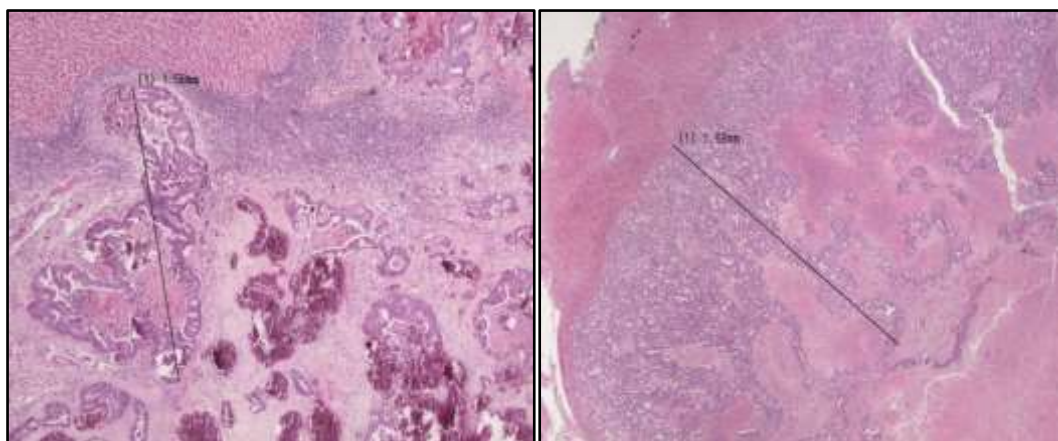


Figura 38. Dois exemplos da medição da espessura na interface tumor-parênquima hepático (TTNI), ambas com TTNI superior a 0,5 mm. Medição efetuada com recurso a *software* especializado e devidamente calibrado, H&E 40x (à esquerda) e 20x (à direita).

Relativamente ao estudo do padrão de crescimento histológico, observou-se que este tinha impacto na sobrevivência global e na sobrevivência livre de doença.

O padrão de crescimento expansivo foi associado a pior OS (HR 6,029, p=0,014), assim como efeito significativo e deletério, com conseqüente pior DFS (HR 8,274, p=0,004), conforme demonstrado na figura 39.

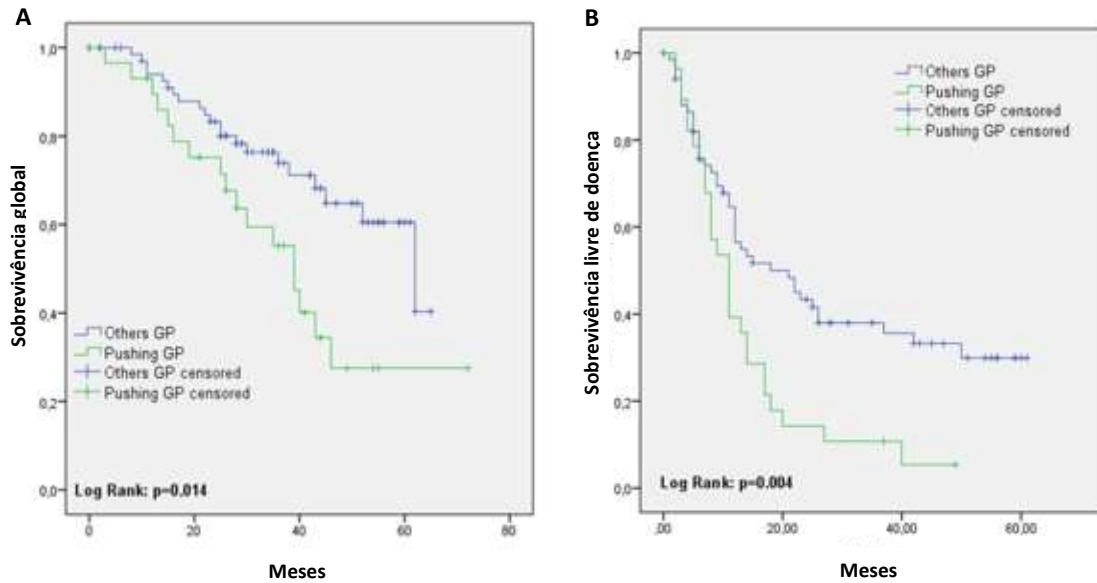


Figura 39. Curvas de Kaplan-Meier refletindo a associação estatisticamente significativa do padrão de crescimento expansivo. Observa-se uma menor sobrevivência global nos doentes com metástases hepáticas de carcinoma colorretal de padrão expansivo (A) e menor sobrevivência livre de doença (B).

Nem todas as associações dos padrões de crescimento tiveram impacto negativo. Conforme se poderá verificar na figura 40, observou-se associação do padrão de crescimento desmoplásico com melhor DFS (HR 0,16, $p=0,012$), no entanto tal efeito não teve significado estatístico na OS ($p=0,280$).

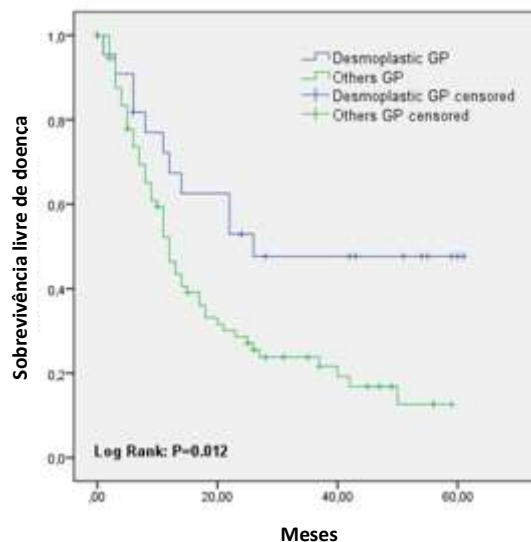


Figura 40. Curvas de Kaplan-Meier representativa do efeito do padrão de crescimento desmoplásico de metástases hepáticas de carcinoma colorretal. É possível observar uma associação estatisticamente significativa entre o padrão de crescimento desmoplásico e melhor sobrevivência global.

Quando analisados os fatores preditores independentes em análise multivariada, identificou-se invasão ganglionar linfática como fator para pior OS ($p=0,037$). Uma margem cirúrgica positiva em hepatectomia exibiu associação com menor DFS ($p=0,018$). O padrão de crescimento expansivo demonstrou impacto deletério na OS e DFS ($p=0,007$ e $p=0,004$, respetivamente). No que diz respeito à sobrevivência livre de recorrência hepática encontrava-se diminuída pela apresentação síncrona de CRC e CRCLM ($p=0,044$) e na ausência de resposta histológica tumoral (TRG5) ($p=0,018$).

Estes fatores estão sumariados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Fatores clínicos e patológicos com influência na sobrevivência global após análise multivariada. HR – Hazard Ratio. CI – confidence interval.

	Sobrevivência global		
	Valor de p	HR	95% CI
Gânglios linfáticos positivos	0,037	2,590	1,061-6,324
Padrão de crescimento expansivo	0,007	2,850	1,328-6,117

Tabela 11. Fatores clínicos e patológicos com influência na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência livre de doença hepática após análise multivariada. HR – Hazard Ratio. CI – confidence interval.

	Sobrevivência livre de doença			Sobrevivência livre de doença hepática		
	Valor de p	HR	95% CI	Valor de p	HR	95% CI
Apresentação síncrona	-	-	-	0,039	2,168	1,038-4,528
Margem de ressecção cirúrgica positiva em hepatectomia	0,018	1,908	1,119-3,254	-	-	-
Padrão de crescimento expansivo	0,004	2,344	1,323-4,155	-	-	-
Ausência de resposta tumoral (metástase hepática)	-	-	-	0,021	2,434	1,146-5,172

1.3 Metástases hepáticas de carcinoma gástrico

A. Amostra em estudo

Mortalidade pós-operatória ocorreu em um doente (3,5%) após gastrectomia total, esofagectomia distal e segmentectomia hepática devido a deiscência anastomótica, com consequente sépsis e disfunção multiorgânica.

Em quatro (21,1%) doentes foi registada morbilidade *major* (graus IIIa-IVb de Dindo; fístula biliar, biloma, efusão pleural e hemoperitoneu) e em dois dos doentes (10,5%), observou-se morbilidade *minor* (graus I e II de Dindo) mais concretamente com infeção superficial do local cirúrgico e abscesso intraperitoneal. A mediana de internamento foi de 10 dias (*range* 4-35)

O *follow-up* decorreu durante uma mediana de 17 meses (*range* 0,5-135) e a OS aos 3 e 5 anos foi de 33,3% e 26,7%, respetivamente. A mediana de sobrevivência global foi de 17 meses (*range* 0,5-135). Dois doentes sobreviveram mais de dez anos após hepatectomia. A sobrevivência livre de doença aos 3 e 5 anos foi de 23,8%, representadas na Figura 41.

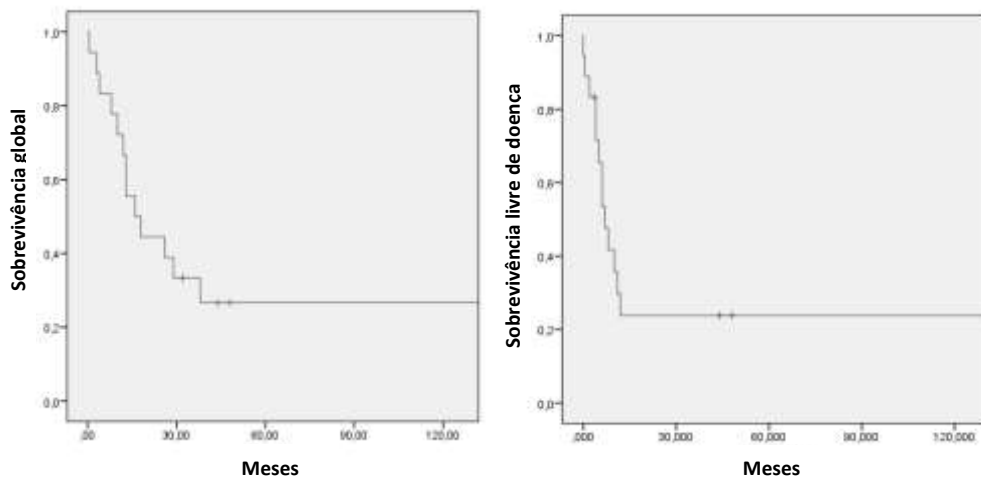


Figura 41. Curvas de Kaplan-Meier relativamente à sobrevivência geral (OS) e à sobrevivência livre de doença (DFS) dos doentes submetidos a hepatectomia por metástases hepáticas de carcinoma gástrico.

Em dez dos doentes foi detetada recorrência de doença (52,6%), nomeadamente a nível hepático em oito (42,1%), cutâneo em um (5,3%) e peritoneal em um (5,3%). Em seis (31,6%) dos doentes esta recorrência tumoral foi detetada no primeiro semestre após hepatectomia. Um dos doentes (5,3%) foi submetido a re-hepatectomia para ressecção de recorrência intra-hepática.

A recorrência tumoral foi a causa de morte de oito doentes (42,1%), sendo que apenas um doente (5,3%) faleceu por causa não tumoral. Os restantes seis doentes

(31,6%) faleceram por causas não determinadas. À data do último *follow-up*, quatro doentes (21,1%) estavam vivos e um (5,3%) tinha desenvolvido recorrência tumoral.

B. Estudo histológico

A gastrectomia conseguiu uma excisão completa da neoplasia (R0) em 18 casos (94,7%) e incompleta (R1) em um caso (5,3%). No âmbito da doença metastática, as margens cirúrgicas foram classificadas como R0 em 11 doentes (57,9%), R1 em cinco doentes (26,3%) e R2 em um (5,3%).

Um tumor primário (10%) e quatro metástases hepáticas (30,1%) revelaram positividade para HER-2 (score 3+). Em dois casos o score HER-2 foi positivo nas metástases com negatividade no tumor primário.

No que diz respeito ao padrão de crescimento das metástases, observou-se padrão infiltrativo em seis (31,6%), expansivo em cinco (26,3%) e desmoplásico em seis (31,5%), representados na figura 42.

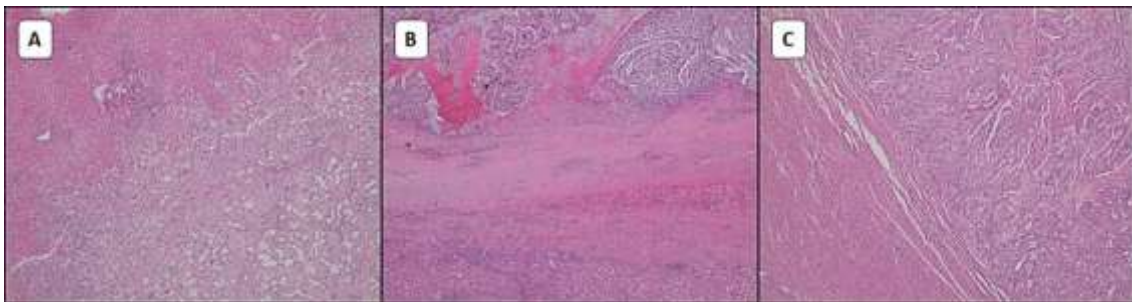


Figura 42. As metástases hepáticas de carcinoma gástrico exibem um padrão de crescimento sobreponível às metástases hepáticas de carcinoma colorretal: A) padrão de crescimento infiltrativo – o tumor permeia por entre as trabéculas e sinusoides, mas sem disrupção da arquitetura hepática, H&E 40x; B) padrão de crescimento desmoplásico – o tumor está separado por uma banda de tecido fibroso, contendo linfócitos, H&E 40x; C) padrão de crescimento expansivo – o tumor expande e comprime os hepatócitos adjacentes, H&E 40x.

Quando se analisaram os fatores clínicos e histológicos com impacto na OS, foi possível identificar que a ausência de morbidade *major* (HR 13,183; $p < 0,001$) e mais de oito meses entre gastrectomia e hepatectomia (HR 5,516; $p = 0,019$) foram fatores de maior OS. A ressecção metácrona teve impacto favorável na DFS (HR 4,064; $p = 0,044$), bem como intervalo entre cirurgias superior a oito meses (HR 8,50; $p = 0,004$).

A análise univariada identificou fatores associados a melhor OS, nomeadamente no tumor primário: localização no corpo e antro (HR 8,065; $p = 0,005$), subtipo histológico papilar e adenocarcinoma, NOS (HR 5,845; $p = 0,016$), tipo intestinal de Lauren (HR 13,333; $p < 0,001$), estádios T1 e T2 (HR 5,997; $p = 0,014$) e tumores de baixo grau (G1 e G2) (HR 5,113; $p = 0,024$).

Relativamente às metástases os fatores associados a melhor OS foram: metástase maior com tamanho igual ou inferior a 2 cm (HR 3,927, $p=0,048$) e padrão de crescimento desmoplásico (HR 4,741, $p=0,029$), conforme se pode observar na figura 43.

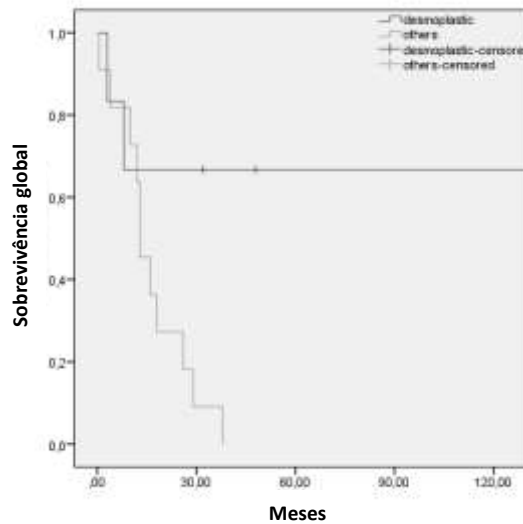


Figura 43. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para a sobrevivência global (OS) para os doentes submetidos a hepatectomia por metástases hepáticas de carcinoma gástrico: OS do grupo com padrão desmoplásico vs. outros ($p=0,029$).

No que respeita à DFS, o estudo das características histológicas evidenciou que o subtipo histológico papilar e adenocarcinoma, NOS (HR 11,895; $p=0,001$), estágio T1 e T2 (HR 4,749; $p=0,029$), ratio de gânglios linfáticos metastizados/gânglios linfáticos totais $<0,5$ (HR 4,076; $p=0,043$), padrão de crescimento desmoplásico das metástases hepáticas (HR 5,013; $p=0,025$) e tamanho da maior metástase hepática igual ou inferior a 2 cm (HR 3,871; $p=0,049$) apresentaram valor significativo para melhor DFS.

Estas associações podem ser consultadas na tabela 12.

Tabela 12. Características clínicas e patológicas da população em estudo – doentes submetido a ressecção hepática por metástases de carcinoma gástrico, com os respetivos preditores de sobrevivência global e livre de doença ($p < 0,05$). HR – *hazard ratio*; GCLM – metástase hepática de carcinoma gástrico; N0 – gânglios linfáticos sem metástase; N+ - um ou mais gânglios linfáticos com doença metastática; G1 – bem diferenciado; G2 – moderadamente diferenciado; G3 – pouco diferenciado; R0 – margem livre; R1 – margem livre inferior a 1 mm; R2 – compromisso macroscópico do plano operatório; TRG – grau de regressão tumoral; TTNI – espessura do tumor na interface tumor/parênquima não tumoral.

Parâmetros	No. de doentes (%)	Sobrevivência global		Sobrevivência livre de doença	
		HR	Valor de p	HR	Valor de p
Género					
Masculino	13 (68,4%)	1,544	0,214	3,038	0,081
Feminino	6 (31,6%)				
Idade					
≤60	14 (73,7%)	0,121	0,728	0,347	0,556
>60	5 (26,3%)				
Distribuição das metástases					
Unilobares	16 (84,2%)	0,271	0,603	0,095	0,758
Bilobares	3 (15,8%)				
Número de metástases					
≤2	16 (84,2%)	1,350	0,245	1,799	0,180
>2	3 (15,8%)				
Tamanho da maior GCLM					
≤20	7 (36,8%)	3,927	0,048	3,871	0,049
>20	12 (63,2%)				
Diagnóstico					
Síncrono	16 (84,2%)	0,081	0,776	0,661	0,416
Metácrono	3 (15,8%)				
Intervalo entre diagnóstico e hepatectomia					
≤6 meses	14 (73,7%)	0,831	0,362	1,598	0,206
>6 meses	5 (26,3%)				
Intervalo entre cirurgias					
≤8 meses	10 (52,6%)	5,516	0,019	8,505	0,004
>8 meses	9 (47,4%)				
Hepatectomia					
Síncrona	7 (36,8%)	3,473	0,062	4,064	0,044
Metácrona	12 (63,2%)				
Extensão da hepatectomia					
<i>Minor</i>	16 (84,2%)	0,282	0,596	0,000	0,984
<i>Major</i>	3 (15,8%)				
Quimioterapia neoadjuvante para o tumor primário					
Sim	2 (10,5%)	0,283	0,595	1,400	0,237
Não	17 (89,5%)				
Quimioterapia neoadjuvante para o tumor secundário					
Sim	12 (63,2%)	0,004	0,947	0,281	0,596
Não	7 (36,8%)				
Quimioterapia adjuvante para o tumor primário					
Sim	1 (5,2%)	0,386	0,534	0,017	0,895
Não	18 (94,8%)				

Quimioterapia adjuvante para o tumor secundário					
Sim	13 (68,4%)	0,031	0,860	0,591	0,442
Não	6 (31,6%)				
Situação pós-operatória					
Morbilidade <i>major</i>	5 (26,3%)	13,183	<0,001	3,150	0,076
Morbilidade <i>minor</i>	14 (73,7%)				
Localização do tumor primário					
Proximal	4 (21,1%)	8,065	0,005	2,057	0,151
Distal	15 (78,9%)				
Estádio do tumor primário					
≤T2	3 (15,8%)	5,997	0,014	4,749	0,029
>T2	16 (84,2%)				
Metástases ganglionares linfáticas					
N0	4 (21,2%)	1,726	0,189	1,520	0,218
N+	15 (78,9%)				
Ratio gânglios linfáticos metastizados/totais					
<0.5	13 (76,5%)	1,799	0,18	4,076	0,043
≥0.5	4 (23,5%)				
Grau do tumor primário					
G1/G2	16 (84,2%)	5,113	0,024	1,945	0,163
G3	3 (15,8%)				
Tipo de Lauren					
Difuso/Indeterminado	3 (15,8%)	13,333	<0,001	2,583	0,108
Intestinal	16 (84,2%)				
Subtipo histológico					
Papilar/adenocarcinoma, NOS	11 (57,9%)	5,845	0,016	11,895	0,001
Outro	8 (42,1%)				
Invasão vascular tumor primário					
Ausente	1 (6,7%)	3,088	0,079	0,005	0,945
Presente	14 (93,3%)				
Status das margens da metástase					
R0	12 (66,7%)	0,180	0,671	0,347	0,556
R1/R2	6 (33,3%)				
Padrão de crescimento das metástases					
Desmoplásico	6 (35,3%)	4,741	0,029	5,013	0,025
Não desmoplásico	11 (64,7%)				
TRG					
≤3	4 (33,3%)	2,188	0,139	2,668	0,102
≥4	8 (66,7%)				
TTNI					
<5 mm	3 (30%)	0,051	0,822	0,301	0,583
≥5 mm	7 (70%)				

Quando analisados os fatores independentes de prognóstico em análise multivariada, a ausência de morbilidade *major*, localização do tumor primário no corpo e antro e padrão de crescimento desmoplásico das metástases hepáticas revelaram-se como fatores independentes preditivos de maior OS ($p < 0,005$).

2. Modelo animal

A. Caracterização das linhas celulares

A caracterização morfológica das células das linhas celulares LS1034, C2BBe1 e WiDr revelou, tanto pela coloração de H&E quer pela coloração de Papanicolau, células com marcada variabilidade na forma e tamanho, com multinucleação, núcleos hipercromáticos e pleomorfismo nuclear severo, bem como citoplasma vacuolizado de acordo com o observado na figura 44.

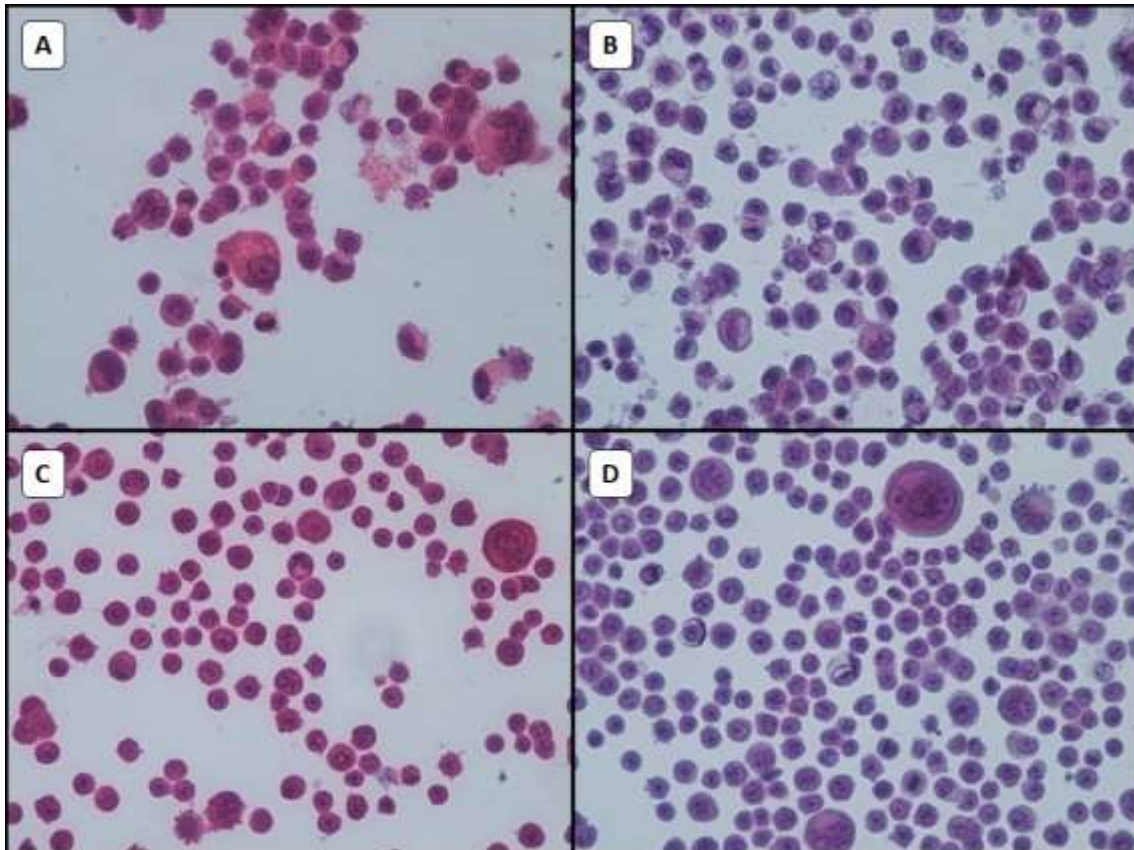


Figura 44. Aspectos morfológicos das células das linhas celulares tumorais utilizadas: nas células das três linhas é evidente marcada anisocitose e anisocariose, com núcleos hipercromáticos e multinucleação. A – linha celular C2BBe1, H&E 400x; B – linha celular C2BBe1, coloração Papanicolau 400x; C – linha celular WiDr, H&E 400x; D – linha celular WiDr, coloração Papanicolau 400x.

Nos estudos imuno-histoquímicos, as células da linha celular C2BBe1 apresentavam marcação focal, mas forte, para CK20, expressão forte e difusa para CDX2, ausência de marcação para P53, conforme representado na figura 45A, com um índice proliferativo de 90%. Para as células da linha celular WiDr obteve-se um padrão forte e difuso para CK20, difuso e de intensidade fraca para CDX2, marcação nuclear para P53 em cerca de 80% das células neoplásicas, exposto na figura 45B e um índice proliferativo de cerca de 80%. Por último, as células da linha celular LS1034 exibiram marcação forte e difusa para CK20, difusa e de fraca intensidade para CDX2, expressão nuclear para P53 em 50-75% das células tumorais e um índice proliferativo de 80%. A expressão de vimentina foi

negativa em todas as células das três linhas celulares. A expressão de E-caderina foi forte e completa e a marcação para beta-catetina foi membranar nas células de todas as linhas celulares. As células das três linhas celulares expressavam marcação para CEA. O estudo com MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 revelou preservação da expressão nuclear para as 4 proteínas de reparação do DNA em todas as linhas celulares, indicando uma baixa probabilidade de instabilidade de microssatélites. No que diz respeito à expressão de CD44, esta foi positiva nas células da linha celular WiDr, indiciando a presença de *cancer stem cells*, representada na figura 45C. Não se obteve expressão para CD133 nas células das linhas celulares estudadas. A marcação para VEGF foi forte nas células da linha celular WiDr, revelada na figura 45D, com expressão muito ténue e focal nas células das restantes linhas celulares.

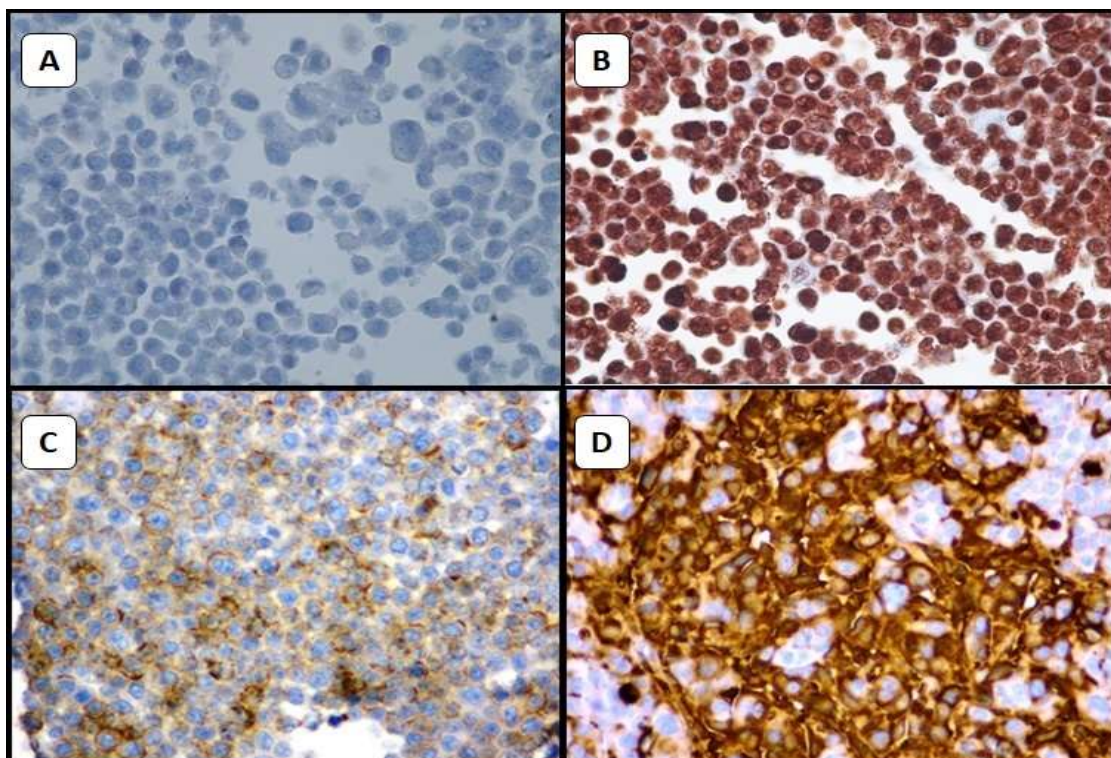


Figura 45. Estudos imuno-histoquímicos: ausência de expressão para P53 nas células da linha celular C2BBE1, 400x (A); marcação nuclear forte e difusa para P53 nas células da linha celular WiDr, 400x (B); expressão membranar de CD44 nas células da linha celular WiDr, 400x (C); expressão membranar forte para VEGF nas células linha celular WiDr, 400x (D).

As características imuno-histoquímicas das células das três linhas celulares estão resumidas na Tabela 13.

Tabela 13. Resumo dos resultados imuno-histoquímicos nas células de cada uma das respectivas linhas celulares. F: expressão focal (em menos de 50% das células); D: expressão difusa (em 50% ou mais das células); S: marcação de intensidade forte; W: marcação de fraca intensidade; 0: sem marcação nuclear; 3: expressão nuclear em 50-75% das células; 4: marcação nuclear em mais de 75% das células; N: negativo; P: positivo; Mb – marcação membranar; E-c: E-caderina; B-c: beta-catenina; sIMS – *status* de instabilidade de microssatélites; MSS – estabilidade de microssatélites.

Linha celular	CK20	CDX2	P53	Ki67	VMT	CD44	CD133	CEA	E-c	B-c	sIMS
LS1034	D/S	W/D	3	80%	N	N	N	S/D	S	Mb	MSS
C2BBe1	F/S	D/S	0	90%	N	N	N	S/D	S	Mb	MSS
WiDr	D/S	F/S	4	80%	N	P	N	W/D	S	Mb	MSS

B. Testes de citotoxicidade

Por forma a avaliar a sensibilidade e a citotoxicidade específica a células NK das linhas celulares de CRC utilizadas neste estudo, foi utilizado um teste de desgranulação comparando o aumento reativo de CD107a após co-cultura das três linhas tumorais com células NK provenientes de doadores humanos saudáveis. Como referência foi utilizada uma linha celular sensível a citotoxicidade NK, mais concretamente a linha K562, obtida através de cultura de uma leucemia mieloide crónica. As linhas celulares revelaram sensibilidade diminuída a morte celular induzida por células NK, patente na figura 46A, e baixa secreção de IFN- γ , conforme se poderá ver na figura 46B.

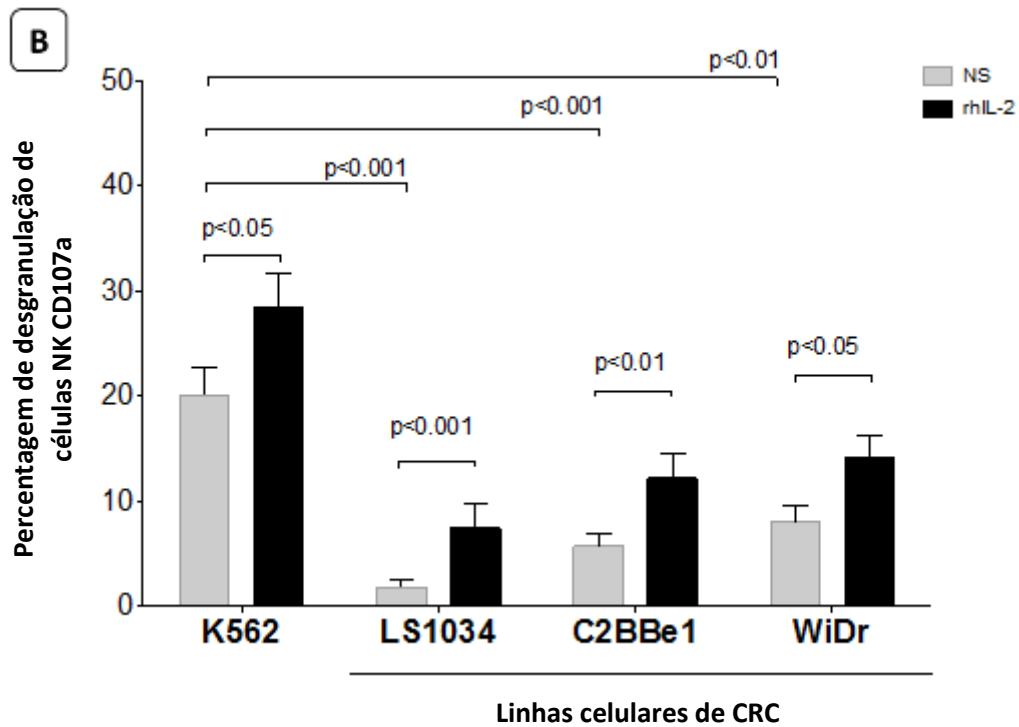
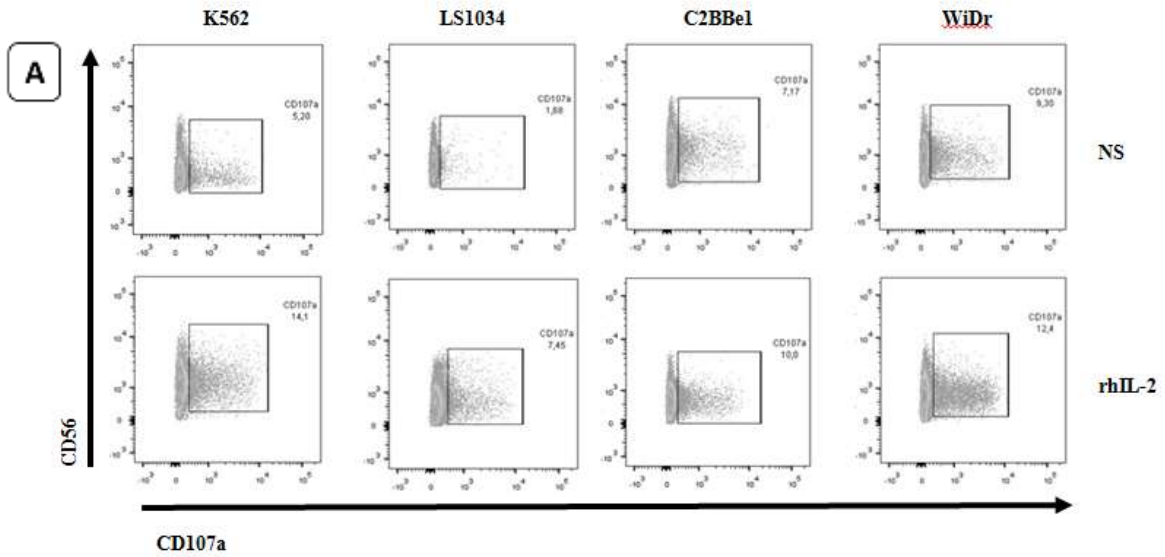


Figura 46. (A) *Dot plots* obtidos por citometria de fluxo revelando desgranulação (percentagem (%)) de células NK com CD107a após co-cultura com linhas celulares de carcinoma colorretal (CRC), sem estimulação (NS) e com estimulação com IL-2 recombinante humana (rhIL-2) por 24h proveniente de dadores saudáveis. Os *dot plots* comparam a percentagem de expressão de CD107a com o número de linfócitos CD3 negativos e CD56 positivos (CD3-/CD56+) e representam cada linha celular, incluindo a linha de referência K562, e condição, não estimulada (NS) e estimulada com rhIL-2.

(B) Representação gráfica da análise da desgranulação de células NK obtidas de 20 dadores saudáveis. Observou-se diminuição significativa da sensibilidade para a lise celular induzida por células NK para as três linhas celulares de CRC, quando comparadas com a linha sensível K562. A estimulação com IL-2 aumenta a percentagem de células tumorais mortas para todas as linhas celulares, no entanto, as linhas celulares de CRC continuam a exibir uma sensibilidade inferior e estatisticamente significativa para morte celular induzida por células NK.

A estimulação com rhIL-2 durante 24h promoveu a restauração parcial das capacidades citotóxicas das células NK, embora num nível inferior ao observado na linha celular de controlo K562, demonstrado na figura 47.

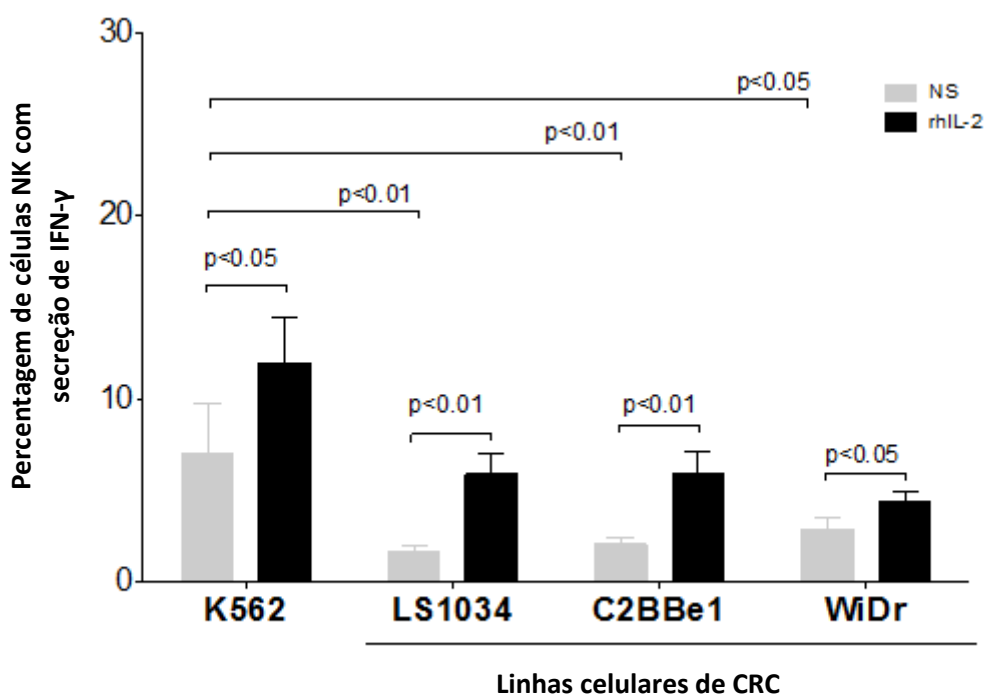


Figura 47. Representação gráfica das células NK secretoras de IFN- γ obtidas de 20 dadores saudáveis, após co-cultura com as linhas tumorais de CRC. A habilidade para induzir a produção de citocinas das células NK está significativamente reduzida por todas as linhas celulares. As linhas LS1034 e C2BBE1 aparentam uma resposta significativa após estimulação com rhIL-2, quando comparadas com a linha WiDr. NK – células *natural killer*. IFN- γ – Interferão gama.

As células NK após interação com as células alvo realizam secreção de citocinas, efeito esse observado para o IFN- γ – quando comparado com os testes de desgranulação, tendo-se verificado um potencial equivalente das linhas celulares LS1034 e C2BBE1. As comparações entre as três linhas celulares permitiram estabelecer uma hierarquia no que diz respeito à capacidade de resistência à morte por células NK e de produção de citocinas.

c. Modelo ortotópico de carcinoma do cego e da transição retossigmoide

A mortalidade perioperatória foi nula, mas após a cirurgia e antes da inoculação das células de CRC – 18º dia, a mortalidade foi de 9% (n=2 do grupo A), deixando um total de 20 animais do grupo A vivos a essa data. No grupo B e grupo C não se registaram mortes.

Relativamente às taxas de sobrevivência após inoculação das linhas celulares, até aos 60 dias após implantação, registou-se uma sobrevivência global de 90,9% (50 de 55).

A taxa de sobrevivência por grupo foi de 90,9% (20 de 22, grupo A), 85,7% (18 de 21, grupo B) e 100% (12 de 12, grupo C), conforme retratado na tabela 14.

Tabela 14. Taxas de sobrevivência global, desenvolvimento tumoral local e à distância dos animais de acordo com as três diferentes linhas tumorais inoculadas.

	Linha celular					
	WiDr		C2BBe1		LS1034	
	Cego	Retossigmoide	Cego	Retossigmoide	Cego	Retossigmoide
Sobrevivência global (%) aos 60 dias de estudo	6/6 (100)	14/16 (87,5)	6/6 (100)	12/15 (80)	6/6 (100)	6/6 (100)
Incidência tumoral (%)	3/6 (50)	10/16 (62,5)	0/6 (0)	8/15 (53,3)	0/6 (0)	0/6 (0)
Invasão neural (%)	0/6 (0)	1/16 (6,25)	0/6 (0)	0/15 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Metástases linfáticas (%)	0/6 (0)	0/16 (0)	0/6 (0)	0/15 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)
Metástases hepáticas/pulmonares (%)	0/6 (0)	0/16 (0)	0/6 (0)	0/15 (0)	0/6 (0)	0/6 (0)

D. Análise histológica

A análise histológica revelou resultados diferentes para cada uma das três linhas celulares inoculadas, com diferentes arquiteturas e padrões morfológicos.

No grupo A, após inoculação da linha WiDr, 59% dos animais (13 de 22) desenvolveram tumores primários – 3 de 6 no cego (representado na figura 48) e 10 de 16 na colostomia distal.

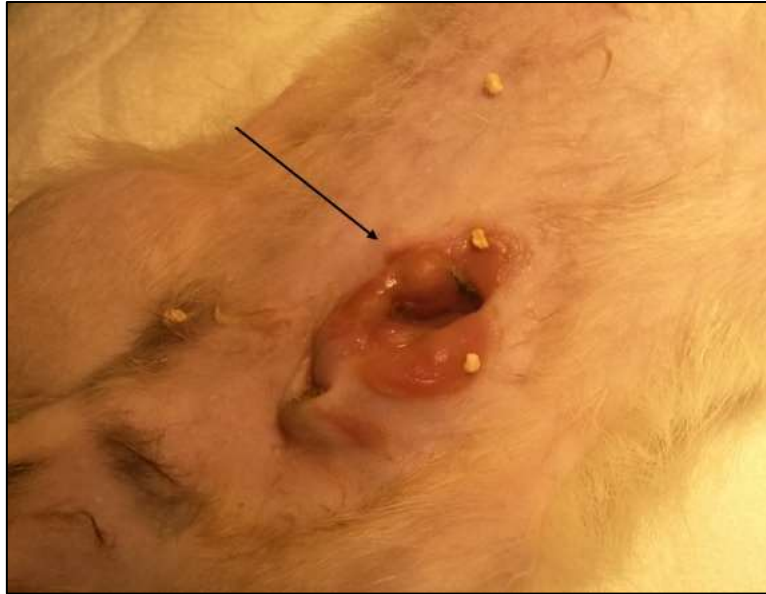


Figura 48. Colostomia com lesão nodular (seta negra), submucosa, que ao estudo histológico correspondia a adenocarcinoma.

Os tumores foram maioritariamente classificados como adenocarcinomas moderadamente/pouco diferenciados, reproduzidos na figura 49, com morfologia similar à observada no ser humano, sem evidência de doença metastática.

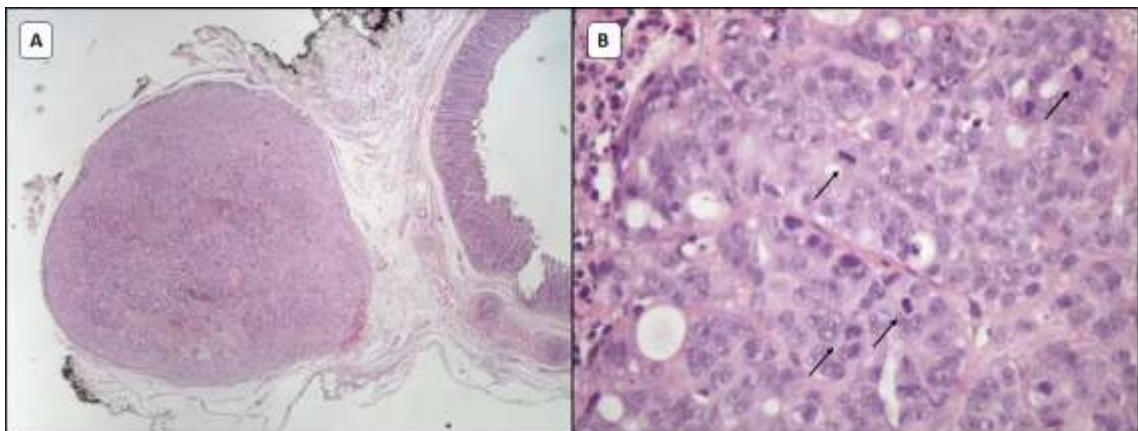


Figura 49. Imagens representativas de uma amostra histológica isolada de um estoma colorretal após inoculação com 1×10^7 células da linha celular WiDr: A – tumor desenvolvido na parede do cólon, com um padrão expansivo, H&E 40x; B – arquitetura tumoral: tumor sólido com focos cribriformes e esboço de lúmen glandular, com elevado número de mitoses, incluindo formas atípicas (setas negras), H&E 400x.

Foram observadas ainda características de invasão local, nomeadamente disseminação neural via plexo mioentérico, exibida na figura 50.

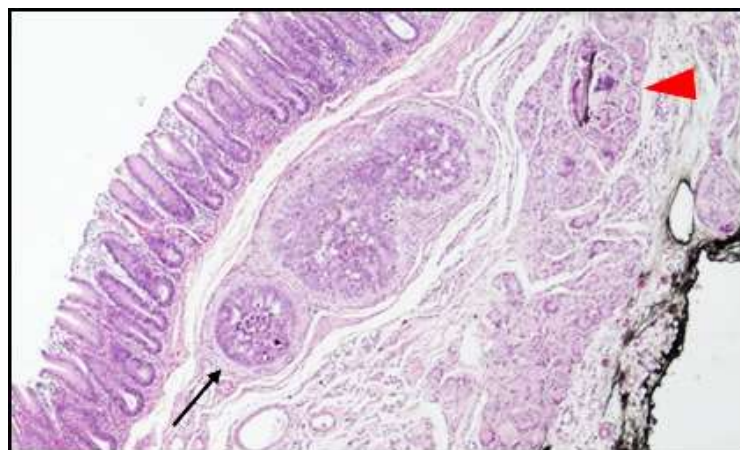


Figura 50. Imagem representativa de uma amostra histológica isolada de um estoma colorretal após inoculação com 1×10^7 células da linha celular WiDr: invasão neural do plexo mioentérico (seta negra), sendo possível visualizar ainda reação de corpo estranho, reação comum neste tipo de modelos animais (ponta de seta vermelha), H&E 40x.

Relativamente ao grupo B, onde os animais foram inoculados com a linha tumoral C2BBe1, 38% dos animais (8 de 21) desenvolveram tumores primários, apenas a nível da colostomia distal. Os tumores foram classificados como moderadamente/pouco diferenciados, por vezes exibindo arquitetura mucinosa e micropapilar, sobreponível à que se observa em pacientes humanos, conforme se poderá observar na figura 51.

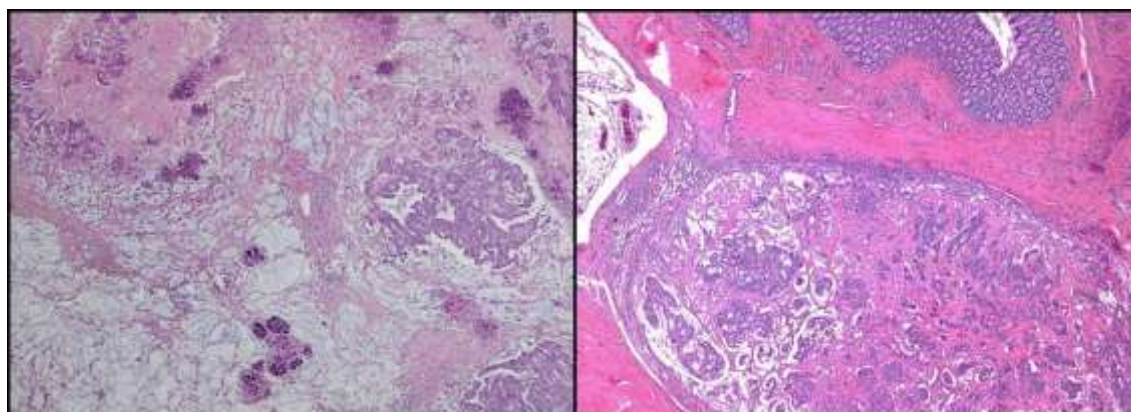


Figura 51. Imagens representativas de amostras histológicas isoladas de um estoma colorretal após inoculação com 1×10^7 células da linha celular C2BBe1: tumor com padrão mucinoso e micropapilar, H&E 40x (à esquerda) e 20x (à direita).

No grupo C, nenhum dos animais inoculados com a linha celular LS1034 desenvolveu tumor primário.

A taxa de desenvolvimento de tumores primários e secundários pode ser consultada na tabela 14.

No que diz respeito aos estudos imuno-histoquímicos complementares, obteve-se marcação para P53 e CD44 nos animais inoculados com a linha celular WiDr, quer no tumor primário quer nos implantes neurais, representadas na figura 52, bem como

expressão de VEGF na periferia do tumor, evidente na figura 53. Estes achados são consistentes com os obtidos na caracterização das linhas celulares.

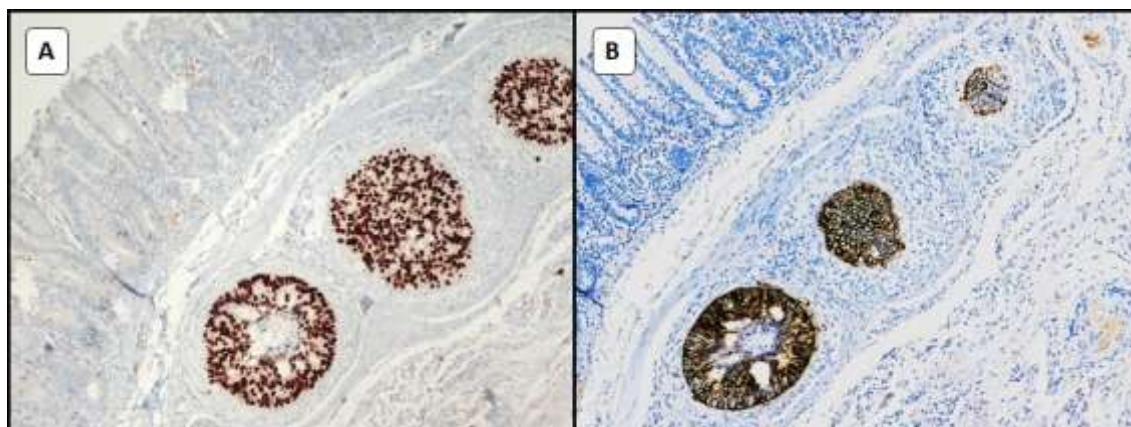


Figura 52. Imunomarcacão para P53 (A) e CD44 (B) nos implantes neurais de adenocarcinoma do c3lon obtidos com a inoculaç3o da linha celular WiDr, 100x.

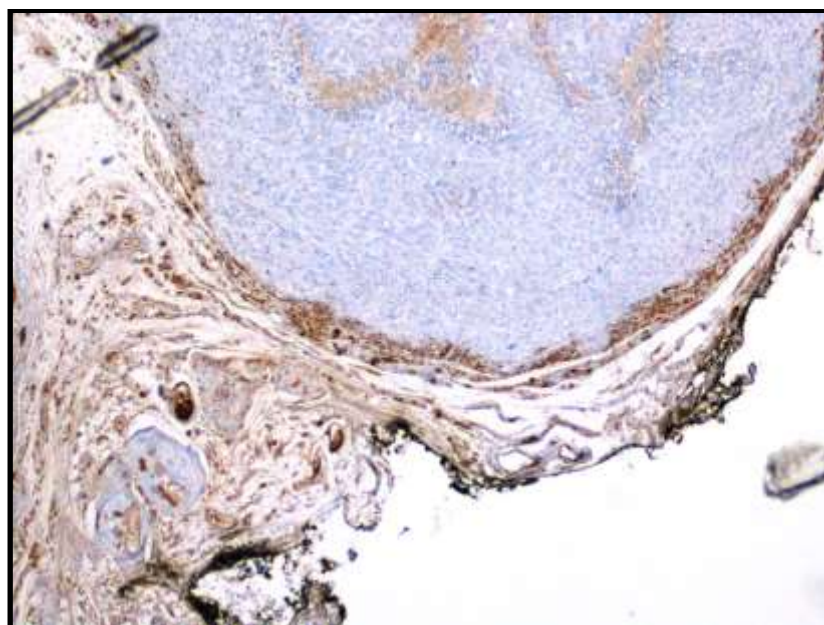


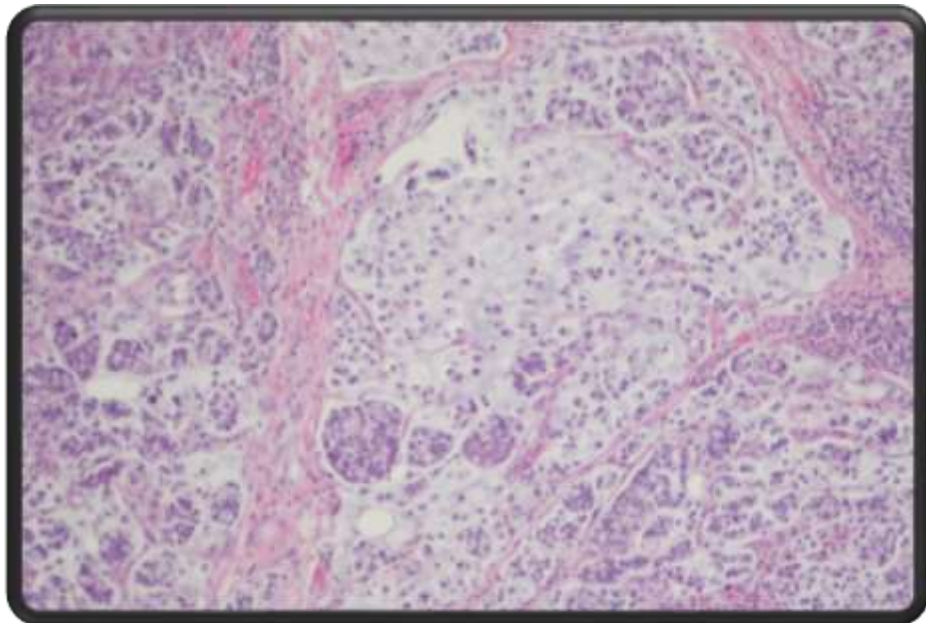
Figura 53. Imunomarcacão para VEGF, evidente na periferia do adenocarcinoma do c3lon obtido com a inoculaç3o da linha celular WiDr, 40x.

E. Avaliaç3o in vivo por m3todos de medicina nuclear

No que diz respeito às t3cnicas de medicina nuclear utilizadas, observou-se captaç3o de ^{99m}Tc-MIBI nas 3reas de projeç3o correspondentes ao local de inoculaç3o das linhas celulares nos animais. Estes achados estavam em relaç3o com o estudo anatomopatol3gico.

Capítulo VI

Discussão



O carcinoma colorretal (CRC) é uma neoplasia com elevada incidência. Em 2018 foi o segundo cancro mais comum na Europa, com cerca de 500.000 novos casos⁴¹⁹, e no que respeita a mortalidade foi responsável por 9,2% de todas as mortes relacionadas com cancro, ocupando assim o segundo lugar nesta categoria⁷. Apesar de todos os esforços na promoção de um estilo de vida saudável, rastreio e campanhas de prevenção de CRC, a incidência deste tumor tem aumentado, especialmente em doentes mais jovens⁴²⁰, muito provavelmente em associação com o denominado “estilo de vida ocidental”, com consequências a nível de saúde pública e encargos financeiros⁴²¹. Estudos epidemiológicos estimam que a incidência de CRC irá aumentar até 2030 em cerca de 60%, com mais de 2 milhões de novos casos e mais de um milhão de mortes³.

A grande causa de morte nestes doentes deve-se a doença disseminada¹⁶¹. A grande maioria das metástases de CRC estão localizadas no fígado, com cerca de 25% dos doentes a apresentarem-se com doença síncrona e cerca de 70% dos doentes a desenvolverem metástases hepáticas metácronas^{422,423}. Em pacientes com doença hepática localizada, a cirurgia apresenta-se como a única opção curativa, com bons resultados aos 5 e 10 anos, atingindo sobrevivências globais respetivamente de 40% e 25%⁴²⁴; em coortes selecionadas de doentes com CRCLM a sobrevivência livre de doença pode atingir os 97% aos 10 anos após cirurgia⁴²⁵, embora, apesar destes cenários favoráveis, nem todos os doentes são candidatos a cirurgia.

O desenvolvimento de agentes de quimioterapia mais eficazes e o refinar de técnicas cirúrgicas levou a um aumento do número de doentes passíveis de cura, no entanto a importância da correta seleção de doentes deverá ser efetuada com maior tenacidade. Nem todos os doentes revelam benefício a longo prazo da cirurgia, exibindo recorrência hepática de CRCLM nos primeiros dois anos após cirurgia⁴²⁶. Para além disso, a cirurgia hepática está associada a riscos de morbilidade e mortalidade peri-operatória, com compromisso da qualidade de vida^{427,428}. Estes dados revestem-se de importância acrescida quando atualmente há opções menos invasivas e com menor morbilidade quando comparadas com a hepatectomia, como por exemplo a ablação térmica, podendo competir com a ressecção hepática a nível da sobrevivência global⁴²⁹.

1. Carcinoma colorretal e microambiente

O contexto no qual o CRC se desenvolve é igualmente de importância. Conforme pudemos observar, doentes que desenvolveram CRC após transplante hepático e renal, revelaram uma doença muito agressiva, com elevada mortalidade, devido a baixa atividade do sistema imune, limitando algumas terapias. Mais uma vez a detecção precoce e a correta seleção de doentes para cirurgia é fundamental. Um conhecimento mais detalhado do microambiente tumoral deverá permitir uma seleção mais personalizada dos doentes. Novos genes de fusão têm sido identificados nos CRCs, com terapêuticas dirigidas a alvos moleculares eficazes, tal como o *NTRK*. Este tem revelado particulares associações com o microambiente tumoral tais como a instabilidade de microssatélites, a produção de mucina pelo tumor, denso infiltrado inflamatório tumoral e lateralidade (cólon esquerdo), abrindo possibilidades de terapia personalizada²²⁸. Estas alterações genéticas, embora menos frequentes no CRC, podem ser importantes em contextos específicos, nomeadamente imunossupressão.

Neste âmbito, o trabalho visou uma caracterização detalhada do CRC e do seu microambiente tumoral, num cenário específico de imunossupressão.

Os nossos resultados confirmam que o CRC, numa situação de imunossupressão, neste caso após transplante de órgão sólido, apresenta uma mortalidade elevada, tendo-se observado que os doentes da coorte de transplante renal faleceram todos após uma mediana de 8 meses.

Ambas as coortes apresentaram uma incidência elevada de CRC, mais concretamente, de 1:151 na coorte do transplante hepático e de 1:380 na coorte do transplante renal, quando comparadas com a população geral^{1,3}. Os doentes de ambas as coortes apresentavam CRC com uma idade mediana de 55 anos, no que diz respeito à coorte hepática, e 61 anos relativamente à coorte dos doentes com transplante renal, contra a idade mediana de 67 anos, descrita em seer.cancer.gov (acedido em fevereiro/2019)⁴³⁰.

No que diz respeito à localização do CRC, ambas as coortes exibiam uma preferência para o cólon esquerdo, no entanto o reduzido número de doentes não permitiu retirar conclusões. Não obstante, esta preferência poderá traduzir-se em opções terapêuticas diferentes, uma vez que doentes com CRC do cólon esquerdo estão descritos na literatura como beneficiários de terapia adjuvante com regimes baseados em 5-FU e terapias com anti-EGFR, estando associados com melhor prognóstico; já os doentes com CRC do cólon direito não respondem bem à quimioterapia convencional, mas poderão beneficiar de terapias imunes com base na sua carga mutacional elevada²⁷⁵

Do ponto de vista histológico os tumores apresentavam características de maior agressividade biológica, com extensa necrose em sete dos dez doentes submetidos a cirurgia, atributo que tem sido apontado como indicador de pior prognóstico⁴³¹. A grande maioria dos doentes apresentou-se em estádios avançados de doença, nomeadamente estágio III e IV em sete de dez doentes submetidos a cirurgia, e nove destes apresentavam um crescimento de tipo infiltrativo associado a alto grau de *tumor budding* e disrupção tecidual, e conseqüentemente, pior prognóstico, conforme o descrito por Koelzer *et al.*³⁸⁷

O microambiente tumoral exibiu, em 50% dos tumores, uma baixa atividade inflamatória, e em oito dos dez doentes submetidos a cirurgia o número de eosinófilos era baixo ou mesmo ausente. Estes achados estão em consonância com uma maior agressividade tumoral, visto que um elevado número de eosinófilos está normalmente associado a um microambiente com capacidade de modulação tumoral⁴³². A densidade do infiltrado inflamatório também é um bom biomarcador de melhor prognóstico, com maior sobrevivência global e livre de doença nos doentes que apresentavam um infiltrado inflamatório mais denso no estroma peritumoral⁴³³. Os doentes estudados neste trabalho apresentaram inflamação do estroma peritumoral de baixa densidade, em relação com o estado de imunossupressão e conseqüente modulação do microambiente. Ainda em associação com estes achados, o número de células *Natural Killer* (NK) estava igualmente diminuído, sem células NK detetáveis por imunohistoquímica. As células NK são capazes de reconhecer as células tumorais e promover a sua destruição, especialmente as células promotoras de crescimento tumoral⁴³⁴. Por outro lado, tem sido reconhecida a capacidade das células tumorais iludirem este mecanismo de defesa, como um evento promotor do crescimento tumoral; assim, as terapias que visam estimular as células NK têm vindo a ser desenvolvidas e descritas como eficazes no tratamento do CRC⁴³⁵⁻⁴³⁷. Ambas as coortes de doentes apresentavam depleção de células NK, podendo indicar que em situação de imunossupressão as terapias com base em células NK não serão eficazes.

Ainda no âmbito do microambiente tumoral, os tumores da amostra de doentes estudada não expressaram *programmed death ligand 1* (PD-L1). A expressão de PD-L1 tem vindo a ser reportada, nos últimos anos, como um marcador para terapêutica com inibidores dos *checkpoints* imunes no CRC⁴³⁸. A expressão de PD-L1 pelas células tumorais induz a supressão do eixo PD1/PD-L1 e a sua deteção por métodos de imunohistoquímica constitui um bom marcador de provável resposta à terapêutica com inibidores dos *checkpoints* imunes; estes fármacos potenciam a capacidade do sistema imune de interagir com as células tumorais e promover a sua destruição^{231,439}. Em doentes imunossuprimidos, como neste caso, cada estratégia anti-tumoral será de considerar, sendo que, normalmente, um elevado número de linfócitos intratumorais está associado a sobre-expressão de PD-L1⁴⁴⁰. No entanto, na totalidade dos doentes estudados, o sistema imune apresentou uma atividade reduzida e sem expressão de PD-

L1, o que permite inferir que esta abordagem terapêutica não parece ser eficaz. Apesar do exposto, a terapia com inibidores dos *checkpoints* imunes pode ser uma possibilidade, mesmo com ausência de expressão para PD-L1, desde que outros fatores estejam presentes, nomeadamente instabilidade de microssatélites (MSI) e alta carga mutacional tumoral⁴⁴¹.

No que diz respeito às características intrínsecas do tumor, registou-se uma frequência aumentada de MSI, mais concretamente de 40%, quando comparada com os 10-15% descritos na literatura para CRC⁴⁴². Isto poderá ser consequência de um erro de amostragem, consequência da escolha de CRC após transplante, ou estar em associação com um subgrupo de CRC definido por características moleculares²⁴⁶ que poderá beneficiar do estado de imunossupressão para se desenvolver. O conhecimento do estado de MSI é deveras importante, pois pode abrir uma janela terapêutica com fármacos anti-PD-L1, mesmo na ausência de expressão de PD-L1^{439,440,443}. Associação com síndrome de Lynch nos doentes com MSI foi excluída através da consulta dos registos médicos dos doentes.

Em ambas as coortes, os CRC exibiram ainda sobre-expressão de *cancer stem cells* (CSC), através da avaliação imuno-histoquímica com CD133, CD44 e ALDH1. A presença de CSC é um fator bem conhecido de agressividade tumoral e de resistência à terapia^{329,444-446}. Desta forma, a sobre-expressão destes marcadores, nas coortes de doentes estudadas, poderá estar associada a um microambiente deficitário em atividade imune, incapaz de ter sob controlo a evolução clonal das células tumorais.

A avaliação da expressão de P53 revelou mutação em 50% dos doentes, o que está de acordo com o descrito na literatura⁴⁴⁷, representando um comportamento mais agressivo e associado a resistência às terapias antitumorais convencionais⁴⁴⁸. Por último, foram encontradas mutações *KRAS* em cinco doentes (41,7%), frequência em consonância com o descrito na literatura⁴⁴⁹. A pesquisa de mutações do gene *KRAS* é efetuada de forma rotineira de doentes com CRC em estágio avançado, visto que são sinónimas de resistência aos fármacos anti-EGFR e estão associadas a uma doença mais agressiva⁴⁵⁰.

Este estudo apresenta algumas limitações, nomeadamente a natureza retrospectiva e uni institucional das coortes clínicas.

No que diz respeito à coorte de doentes que desenvolveram CRC após transplante hepático e/ou renal é preciso ter em consideração que alguns doentes que foram transplantados na nossa instituição são seguidos noutros centros hospitalares, com perda de *follow-up*, pelo que a nossa coorte de doentes com CRC após transplante poderá ser ainda superior. No entanto, não há muitas coortes acerca deste assunto, e no caso de CRC após transplante hepático, a maioria das publicações foca-se nos doentes submetidos a transplante hepático por colangite esclerosante primária, representando um conjunto muito específico de doentes, normalmente com colite

ulcerosa associada e, conseqüente, risco aumentado de CRC^{451,452}. Os estudos referidos na literatura exibem números similares aos das nossas coortes⁴⁵²⁻⁴⁵⁸, no entanto apenas descrevem incidência, localização de CRC e estágio tumoral, sem uma classificação detalhada do tumor, nomeadamente *a presença de MSI, mutações TP53, cancer stem cells* e a descrição do microambiente tumoral.

2. Metástases hepáticas de carcinoma do cólon e gástrico

A disseminação metastática para o fígado é ainda um desafio terapêutico. Fatores relativos ao hospedeiro e ao próprio tumor necessitam de ser tomados em consideração para uma intervenção multidisciplinar e personalizada.

Não obstante a importância do CRC primário, atendendo a que a mortalidade se deve na sua maioria a lesões secundárias, a necessidade de uma abordagem personalizada para as CRCLM é de uma importância fulcral, com discussão de doentes em estágio IV em reunião multidisciplinar⁴⁵⁹. A decisão por uma opção cirúrgica deverá ter por base não apenas a possibilidade de ressecção da lesão, mas também a biologia do tumor e do doente, necessitando por isso de biomarcadores específicos e sensíveis, capazes de auxiliar essa decisão multidisciplinar⁴⁶⁰.

Os níveis elevados de marcadores tumorais séricos, nomeadamente o CEA, têm sido ligados a pior prognóstico^{461,462}. Outros fatores igualmente reconhecidos como associados a pior prognóstico são: o tamanho da maior CRCLM; a evidência de doença extra-hepática – mais concretamente pulmonar e peritoneal; um menor tempo entre a apresentação do CRC primário e a CRCLM; e apresentação síncrona do tumor primário e da metástase⁴²⁴. A caracterização mais frequente de mutações *RAS* em doentes com CRC tem sido de valor acrescido, com identificação de menor sobrevivência global em doentes com mutações *KRAS*⁴⁶³. O valor prognóstico isolado de cada fator é limitado e vários *scores* têm sido propostos para providenciar uma avaliação de risco, no entanto estes *scores*, embora úteis, podem ser limitados para uma decisão denominada de individualizada⁴⁶⁴. Estes critérios representam ainda apenas a agressividade tumoral e não traduzem a tão desejada interação tumor / hospedeiro, essencial para compreender a relação entre estes dois compartimentos e progredir no caminho da medicina personalizada.

A ressecção hepática é o *gold standard* de tratamento de doentes com CRCLM e é a intervenção aceite em metástases hepáticas de outras localizações; mesmo doentes considerados inicialmente irresssecáveis podem ser tratados com quimioterapia neoadjuvante e posterior hepatectomia, com baixa morbidade^{407,465}.

Nos últimos anos várias técnicas cirúrgicas para o tratamento de CRCLM têm emergido²⁵⁰, desde hepatectomias a dois tempos^{466,467} a intervenções poupadoras de parênquima⁴⁶⁸, com ou sem termodestruição⁴⁶⁹. Recentemente, e em situações selecionadas, o transplante hepático tem vindo a ser uma possibilidade, aumentando o leque terapêutico⁴⁷⁰. De uma forma geral podemos encarar as metodologias cirúrgicas em dois grandes grupos: um que contempla cirurgias radicais, a dois tempos, com hipertrofia hepática acelerada, tal como a *Associating Liver Partition with Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy*, que defende que as metástases na proximidade de pedículos vasculo-biliares devem ser submetidas a ressecções completas (R0), com o

sacrifício inevitável de grandes volumes de parênquima hepático. Normalmente necessitam de modulações do fluxo venoso hepático^{466,471,472}, e embora atrativas, apresentam elevada morbidade e mortalidade e baixa probabilidade de re-hepatectomia em caso de recorrência hepática; o outro grupo contempla ressecções a tempo único, poupadores de parênquima, ainda que à custa de margens cirúrgicas positivas (R1). Esta última estratégia preserva uma maior quantidade de tecido hepático e apresenta menor morbidade, permitindo ainda uma maior taxa de re-hepatectomias em caso de recorrência intra-hepática. Neste contexto estudos têm demonstrado que a ressecção cirúrgica justa estruturas vasculares (R1) apresenta uma sobrevivência global similar às ressecções radicais (R0), desafiando o dogma de que as CRCLM devem ser ressecadas com margem cirúrgica idealmente superior a 1 mm⁴⁷³.

Estas estratégias são conceitualmente diferentes, mas nenhuma tem conseguido demonstrar superioridade evidente sobre a outra, com resultados muito sobreponíveis em termos de sobrevivência global⁴⁷⁴. Podemos inferir que, mais do que a técnica cirúrgica, é o comportamento biológico da neoplasia e a sua interação com o hospedeiro, que determinam o prognóstico.

Algumas características biológicas, tais como mutações dos genes *RAS* e *BRAF*, ou origem do tumor primário no intestino médio (do inglês *midgut*) e no intestino distal (do inglês *hindgut*) têm demonstrado associação forte com prognóstico. Estes atributos têm implicações precisas na seleção de terapias biológicas e, só recentemente, surgiram estudos a correlacionar com técnicas cirúrgicas. Nesse sentido, um estudo recente demonstrou que uma ressecção hepática não anatômica está associada a pior prognóstico em doentes com mutações *KRAS*⁴⁷⁵ e, num estudo de 2019, foi demonstrado um maior risco de recorrência local após uma ressecção R1 em doentes com mutações *KRAS*⁴⁷⁶.

Recentemente, um fator de prognóstico muito interessante emergiu na literatura médica – o padrão de crescimento histológico (PC) das CRCLM²⁵⁵. Trata-se de uma característica reprodutível e de fácil avaliação, passível de ser categorizada em lâmina corada pela hematoxilina e eosina (H&E) sem necessidade de testes adicionais. Um estudo macroscópico cuidado, com amostragem adequada e inclusão total para nódulos com tamanho inferior a 3 cm, possibilitará uma avaliação eficaz⁴⁷⁷. Após avaliação histológica o patologista deverá classificar o PC, de acordo com o estabelecido em consensos recentes⁴⁷⁸ em desmoplásico – quando está presente uma banda densa de estroma, rica em linfócitos e em vasos sanguíneos, entre o tumor e o parênquima não-tumoral; em expansivo – quando as células tumorais crescem e comprimem os hepatócitos adjacentes; e em padrão infiltrativo – quando as células tumorais crescem de forma algo irregular, substituindo os hepatócitos não tumorais.

O PC representa mais que um fenótipo histológico, exibindo impacto na sobrevivência global²⁵⁵, com padrões associados a pior prognóstico⁴⁷⁹ e outros a um prognóstico mais favorável⁴⁸⁰.

Com este estudo procurou-se identificar fatores patológicos de prognóstico para doentes com metástases hepáticas e discutir o seu valor em decisões terapêuticas, mais concretamente o efeito do microambiente tumoral no desenvolvimento e agressividade de metástases hepáticas de CRC, através do seu PC histológico, relacionando com sobrevivência global e implicações clínicas. Posteriormente foi efetuada comparação com os padrões de crescimento histológico das metástases hepáticas de carcinoma gástrico.

Estudos recentes demonstraram a importância da quimioterapia neoadjuvante (NAC)^{481,482}, no entanto, nas nossas coortes a NAC foi realizada em doentes com doença mais avançada, quando comparados com os doentes submetidos diretamente a cirurgia, especialmente na coorte de doentes com metástases hepáticas de carcinoma colorretal (CRCLM). Apesar destas diferenças entre os dois grupos, a realização de NAC não esteve associada a diminuição da OS, e o seu impacto adverso na sobrevivência livre de doença não foi consistente após análise multivariada. No entanto há que ter em consideração o efeito deletério da NAC no parênquima hepático não tumoral^{165,483} e cada caso deverá ser ponderado individualmente.

Sendo o CRC muito prevalente na realidade atual⁷, as características dos doentes, atributos do tumor primário, dados operatórios e achados patológicos e seus efeitos na OS dos doentes têm sido o foco de diversos estudos⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁷. Este estudo revelou, na coorte de doentes com CRC, que doentes com idade superior ou igual a 70 anos, gânglios linfáticos metastizados, múltiplas metástases hepáticas e metástases hepáticas com tamanho superior ou igual a 3 cm apresentavam pior OS. Adicionalmente a apresentação síncrona de metástases hepáticas, múltiplas metástases e distribuição bilobar das metástases hepáticas foram identificadas como preditores de recorrência tumoral, em conformidade com o descrito na literatura^{486,488}. Apesar deste valor prognóstico é preciso encarar estes dados com cautela, pois podem negar a hepatectomia a doentes com fatores de risco clínicos, mas com um tumor com comportamento biológico menos agressivo.

A ressecção cirúrgica apresentou-se também como uma opção válida no tratamento de metástases hepáticas de carcinoma gástrico (GCLM), tendo-se obtido, na nossa amostra, uma OS mediana de 17 meses aos cinco anos, que está em consonância com os outros estudos disponíveis na literatura⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹, bem superior à OS mediana de sete meses obtida num estudo que analisou doentes com GCLM não submetidos a cirurgia⁴⁹².

No que diz respeito a fatores clínicos de prognóstico na coorte de doentes com carcinoma gástrico, descrevemos que um intervalo superior a oito meses entre a

ressecção do tumor primário e do tumor secundário foi associado a melhor OS, achado suportado por um estudo de Montagnani *et al.* que associou a ressecção metácrona à maior OS⁴⁹¹. Tal poder-se-á dever a uma seleção de doentes tendo em conta o tratamento de quimioterapia realizado, sendo apenas propostos para ressecção cirúrgica os doentes que responderam melhor à terapêutica. Outros estudos suportam este facto^{493,494}, no entanto, em algumas revisões sistemáticas não foi possível comprovar este efeito benéfico das ressecções metácronas^{490,495,496}.

Estas revisões e meta-análises sugerem como fatores preditivos para melhor OS, metástase hepática solitária e ressecção hepática *minor*, no entanto tais fatores não tiveram impacto estatístico no nosso estudo, surgindo a dimensão da metástase, ou seja, metástases com tamanho inferior a 20 mm, como fator de melhor OS, com significado estatístico, concordante com o descrito por Kinoshita *et al.*⁴⁹⁷ e Ohkura *et al.*⁴⁹⁸. Estes achados confirmam que doentes com baixa carga tumoral e curso clínico indolente são os melhores candidatos para hepatectomia. Relativamente ao tumor primário, características como o tipo histológico, o tipo intestinal de Lauren, melhor diferenciação, localização do tumor no corpo e antro e profundidade de invasão do tumor foram características predictoras de melhor OS, em relação com estudos anteriores^{489,491,495,497}

Observou-se uma correlação forte entre morbidade *major* e menor OS nos doentes com CRCLM. Este achado foi previamente descrito⁴⁹⁹ e tem sido explicado pelo efeito imunossupressor, a nível do microambiente induzido pelos processos inflamatórios e alterações de hipoxia, efeitos esses com potenciação da angiogénese e micrometastização^{500,501}. A morbidade pós hepatectomia está atualmente validada como fator de pior prognóstico em doentes com CRCLM⁴⁹⁹, no entanto, à exceção do estudo de Tatsubayashi *et al.*⁵⁰², não tem sido investigada em doentes com CGLM Na amostra estudada, os doentes submetidos a hepatectomia por GCLM a morbidade *major* revelou-se determinante, a longo prazo, no curso da doença. Uma morbidade *major* poderá limitar o acesso dos doentes a quimioterapia adjuvante, ocorrendo mais tarde ou, até mesmo, impedindo-a.

No que diz respeito à ressecção das CRCLM, o efeito negativo de uma margem positiva macroscópica é geralmente aceite, no entanto a quantidade mínima de parênquima hepático livre é ainda foco de discussão^{473,503-506}. Este estudo demonstrou que uma margem cirúrgica positiva, definida como tumor a menos de 1 mm do plano operatório, aumenta o risco de recidiva tumoral, mas não tem efeito deletério na OS, efeito que tem sido descrito na literatura^{507,508}.

O uso de NAC teve um impacto na histologia tumoral, com melhor resposta de acordo com os critérios definidos por Rubbia-Brandt *et al.*²⁵⁶ Esta resposta tumoral, TRG, tem sido identificada como fator prognóstico em vários estudos, mas com categorização de resposta variável^{256,509,510}. Este estudo dicotomizou a resposta tumoral em presente

ou ausente. Em análise multivariada os resultados demonstram claramente que doentes sem resposta tumoral patológica (TRG5) têm sobrevivência livre de doença diminuída.

Para os doentes com GCLM o *status* das margens cirúrgicas e o grau de resposta tumoral não revelaram associação com prognóstico, achado algo surpreendente. Seria espectável que uma margem cirúrgica negativa e um maior grau de resposta tumoral estivessem em associação com melhor prognóstico, de forma análoga ao que acontece nas CRCLM^{256,505}, no entanto tal não se verificou, podendo estar em relação com o tamanho da amostra.

Em 2010, Dipen Maru *et al.*²⁷¹ apresentaram um novo fator patológico com impacto na sobrevivência livre de doença, a espessura tumoral na interface tumor-parênquima não tumoral. No estudo realizado não se obteve significância estatística que permitisse a validação deste parâmetro, no entanto, não se pode ignorar o facto de que este fator poderá ter um papel importante no prognóstico destes doentes.

Nos últimos anos o estudo dos padrões de crescimento das metástases hepáticas tem atraído interesse da comunidade científica e vários estudos demonstraram o seu efeito no prognóstico^{268,511-513}. No entanto, este estudo estuda a importância do PC em doentes com CRCLM e tratados com NAC. O PC com padrão expansivo foi identificado como o PC com o pior prognóstico, enquanto que o PC desmoplásico foi associado a um melhor prognóstico.

Doentes com PC de tipo desmoplásico na maior CRCLM tinham uma redução do risco de recorrência com significado estatístico ($p=0,012$). Este valor prognóstico foi previamente descrito na literatura⁵¹¹ e, muito provavelmente, deve-se ao papel da banda de estroma rico em colagénio que pode representar uma barreira à expansão tumoral e conferir assim um melhor prognóstico²⁵⁵. O PC desmoplásico pode ainda ser um indicador de um estado de imunidade celular aumentada do hospedeiro em resposta à neoplasia.

O nosso estudo identificou ainda o PC de tipo expansivo como um fator independente de pior OS ($p=0,007$) e sobrevivência livre de doença ($p=0,004$).

De acordo com o estipulado na literatura, o padrão expansivo apresenta propriedades biológicas distintas no que diz respeito à vascularização, nomeadamente elevados níveis de proliferação de células endoteliais^{258,513}, evidência de capilarização, aumento de atividade do fator de crescimento básico dos fibroblastos (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)⁵¹⁴, criando um perfil angiogénico que de certa forma mimetiza o que se passa a nível do CRC primário²⁶¹. Para além disto, o ambiente hipóxico das metástases, caracterizado por elevados níveis de fator induzido por hipoxia (HIF)²⁶¹, vai contribuir para um aumento do VEGF de forma sinérgica⁵¹⁵.

O PC das metástases hepáticas tem sido estudado amplamente nas CRCLM e, recentemente, noutro tipo de tumores, tendo inclusive sido demonstrada correlação com prognóstico em metástases hepáticas de melanoma uveal²⁷⁰.

Nesse âmbito, este estudo demonstrou pela primeira vez o impacto do PC das GCLM. O padrão desmoplásico foi associado de modo independente com melhor OS, de forma análoga ao que acontece com as CRCLM²⁶¹.

Isto reforça a necessidade de um conhecimento mais amplo sobre as interações tumor-hospedeiro, visto que este PC está certamente relacionado com uma maior reação imune do hospedeiro ao tumor. O hospedeiro não é um agente passivo, ou seja, é capaz de ativar uma resposta com intenção de contenção tumoral.

De acordo com o preconizado por Vermeulen *et al.*²⁵⁵, o PC de tipo desmoplásico está associado com um estado pró-apoptótico, sendo caracterizado por dois grandes mecanismos de defesa – menor proporção de células endoteliais, quando comparado com o número de células endoteliais do PC de tipo expansivo e de tipo infiltrativo, e elevada densidade de linfócitos intratumorais, que conjuntamente com os hepatócitos adjacentes à banda de tecido fibroso, expressam grandes quantidades de *Fas-ligand*, um marcador de apoptose. Esta apoptose ocorre nas células tumorais e nas células peritumorais do hospedeiro, contribuindo assim para um fenótipo mais indolente, minimizando a disseminação tumoral; a própria banda de estroma cria uma pseudocápsula²⁵⁵. Este tipo de PC poderá possibilitar uma oportunidade para uma menor margem de ressecção cirúrgica, no entanto, tal facto ainda carece de validação.

Neste trabalho podemos verificar o impacto do PC, observando-se melhor prognóstico nos doentes com PC de tipo desmoplásico em CRCLM, estando o PC de tipo expansivo associado a pior sobrevivência global e sobrevivência livre de doença. De forma muito interessante obtivemos ainda um fenótipo similar nas metástases hepáticas de carcinoma gástrico – desmoplásico, expansivo e infiltrativo, e, igualmente, uma associação entre melhor prognóstico e PC de tipo desmoplásico, descrito pela primeira vez neste trabalho. O estudo e descrição detalhados desta interface e consequente microambiente tumoral é crucial para o prognóstico, permitindo seleccionar doentes com doença menos agressiva e com melhores hipóteses de sobrevivência pós cirurgia, refletindo o impacto da biologia tumoral no comportamento das neoplasias.

Os resultados aqui traduzidos, associados aos descritos na literatura, desafiam a noção que uma metástase hepática não é mais do que um grupo de células neoplásicas sem interações com o parênquima envolvente. Processos biológicos tais como angiogénese, cooptação vascular, efeitos autócrinos e parácrinos de fatores de crescimento e interação com o sistema imune, ocorrem na interface tumor-hospedeiro. Estes eventos explicam os diferentes fenótipos – padrões de crescimento das CRCLM e terão consequentemente implicações distintas na abordagem cirúrgica.

Nesta linha de pensamento, um estudo de 2018 revelou uma taxa superior de ressecções cirúrgicas completas – R0, em doentes com PC de tipo desmoplásico⁵¹⁶. Isto indicia que a presença de uma banda fibrótica, com infiltrado inflamatório, em redor da CRCLM, poderá ser protetora contra uma margem cirúrgica positiva. Se esta banda não estiver presente, no caso dos PC de tipo expansivo e infiltrativo, o doente poderá estar num risco potencialmente acrescido de uma ressecção cirúrgica marginal, com risco aumentado de recorrência intra-hepática. É de crer, que nestas situações, uma margem cirúrgica mais alargada será necessária. Este assunto carece ainda de comprovação, no entanto a possibilidade de prever pré-operatoriamente o PC poderá permitir uma abordagem cirúrgica personalizada.

No entanto, este conhecimento tem ainda pouco impacto em reuniões multidisciplinares de decisão terapêutica, visto que o PC é apenas conhecido após ressecção cirúrgica. O conhecimento deste fator de prognóstico num contexto pré-operatório seria um valor acrescido, permitindo uma decisão terapêutica individualizada.

Uma implicação clínica pertinente do PC de CRCLM é a associação do PC de tipo desmoplásico com sobrevivência livre de doença e padrão de recorrência de doença. Num estudo bem desenhado e muito provocativo, conduzido por Nierop *et al.*⁵¹⁷ em 690 doentes com CRCLM, é descrito que doentes com PC de tipo desmoplásico exibem mais recidiva limitada ao fígado, contrastando com os padrões não desmoplásicos que demonstram recorrência sistémica mais frequente. Estes padrões não desmoplásico – expansivo e infiltrativo, demonstraram ainda uma menor possibilidade de re-hepatectomia. Uma vez mais, o conhecimento pré-cirúrgico do PC poderia auxiliar na estratificação de risco de recorrência de doença de forma individualizada, ou seja, permitiria evitar a escolha de ressecções com elevado potencial de morbilidade e privilegiar modalidades menos invasivas, tal como termodestruição, em doentes com PC não desmoplásico e conseqüentemente com maior risco de recidiva. A ablação local teria ainda o benefício de não adiar os tratamentos oncológicos, um efeito indesejado e inevitável de uma cirurgia hepática agressiva e com efeitos deletérios no prognóstico⁵¹⁸. Para além disto, doentes com PC de tipo expansivo e infiltrativo beneficiarão de regimes neoadjuvantes mais agressivos.

O PC das CRCLM poderá ter ainda repercussões no contexto de transplante hepático. Este método de tratamento de doença metastática tem ganho interesse em casos muito selecionados e poderá ser uma opção válida quando a hepatectomia parcial não é possível⁵¹⁹. Para que o transplante ocorra alguns critérios têm de ser cumpridos, nomeadamente o tumor primário tem de já ter sido removido, o doente tem de exibir resposta a quimioterapia sistémica (não progressão de doença) e doença confinada ao fígado^{520,521}. Neste contexto o papel dos padrões de crescimento poderá ser fulcral, permitindo a seleção de doentes mais propensos a doença confinada ao fígado, mais concretamente os doentes com PC de tipo desmoplásico. Os estudos efetuados nesta

área, não referem o PC das CRCLM nos fígados removidos. O estudo desta característica e suas implicações prognósticas nestes doentes específicos será deveras interessante, especialmente porque não são conhecidos os efeitos da imunossupressão no tipo histológico da recidiva no fígado enxertado.

Se o impacto dos PC das metástases hepáticas está relativamente bem estabelecido no que concerne ao carcinoma colorretal, o seu papel prognóstico em metástases de outros órgãos encontra-se menos explorado. Os padrões são um evento presente em metástases hepáticas de outras neoplasias, nomeadamente melanoma uveal e carcinoma da mama^{270,513,522}. Este estudo aponta pela primeira vez os padrões de metástases hepáticas de carcinoma gástrico e seu consequente impacto em termos de prognóstico, de forma análoga ao que acontece nas CRCLM.

Curiosamente, na nossa experiência clínica, é possível observar que as metástases hepáticas de adenocarcinomas com origem pancreatobiliar também exibem os mesmos padrões observados, conforme se representa na figura 51. Contudo o seu impacto prognóstico ainda tem de ser determinado. Sendo esta situação uma indicação rara para ressecção hepática, com consequentes coortes clínicas de pequenas dimensões, pelo que estudos multicêntricos serão seguramente uma mais-valia neste contexto.

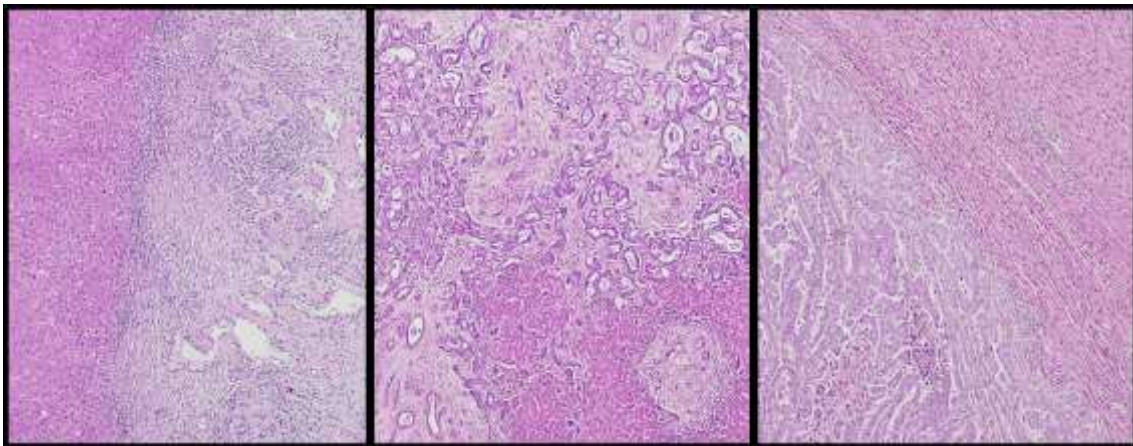


Figura 51. Metástases hepáticas de adenocarcinoma pancreatobiliar. É possível observar os padrões de crescimento descritos para as metástases hepáticas de carcinoma colorretal: desmoplásico (à esquerda), infiltrativo (ao centro) e expansivo (à direita), H&E 40x.

No que concerne às metástases hepáticas de carcinoma da mama^{269,513}, cujos padrões se representam na figura 52, e de melanoma uveal²⁷⁰, parece existir um predomínio do padrão infiltrativo, com uma menor percentagem do padrão expansivo. Curiosamente, na nossa experiência o padrão desmoplásico parece estar menos representado. Uma vez mais estudos multicêntricos serão fundamentais na avaliação desta característica.

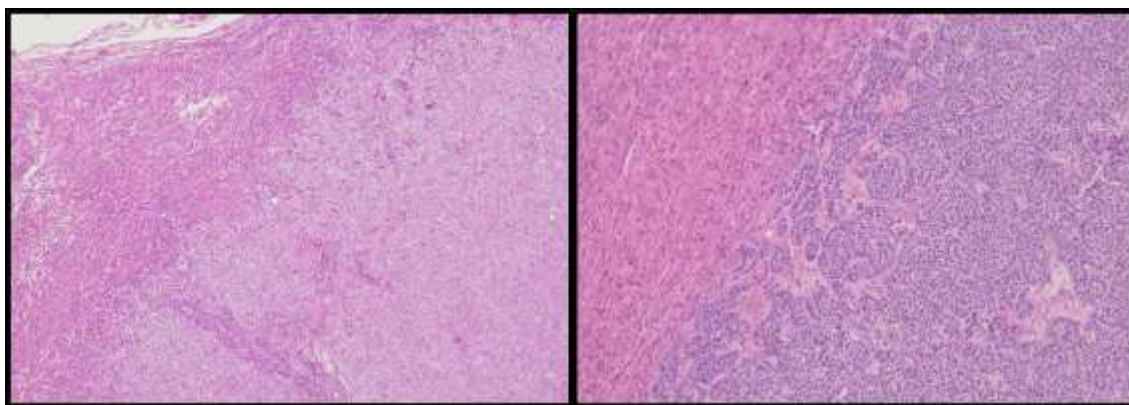


Figura 52. Padrões de crescimento histológico de metástases hepáticas de carcinoma da mama: padrão infiltrativo (à esquerda) e expansivo (à direita).

As indicações para hepatectomia são menos lineares nestes casos, e possivelmente, a previsão com segurança dos PCs poderá selecionar os doentes que beneficiem mais de ressecção hepática e poupar outros a ressecções menos eficazes e com potencial de morbidade, considerando outras alternativas.

A disseminação do estudo do PC das metástases hepáticas de neoplasias não colorretais adiciona novas possibilidades ao tratamento dos doentes e invoca um interesse acrescido. No entanto, os mecanismos biológicos envolvidos não são necessariamente os mesmos. Por exemplo, uma eventual associação entre mecanismos genéticos seria menos consistente, esperando-se uma relação entre mutações nos genes *BRCA 1/2* (do inglês *Breast Cancer*) e *BRAF* e padrão de crescimento em metástases hepáticas de carcinoma da mama e melanoma, respetivamente, atendendo à importância que estes genes têm no desenvolvimento dos respetivos tumores^{523,524}. Será, contudo, de esperar que as propriedades biológicas, nomeadamente no que concerne à vascularização, ou seja, angiogénese e cooptação de vasos, sejam similares²⁶⁹, no entanto tal necessita de ser provado.

Outra implicação clínica muito pertinente destes padrões de crescimento é a sua influência na seleção de terapias dirigidas a alvos moleculares. O tratamento *standard* de CRCLM é baseado no bloqueio do recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), este último com recurso a bevacizumab, um agente antiangiogénico⁴⁰². A presença de mutações *RAS*, que pressupõe resistência aos agentes anti-EGFR, normalmente favorece o uso de agentes anti-VEGF⁵²⁵. Não obstante este facto, dado que o PC de tipo desmoplásico está associado a um perfil angiogénico, a previsão deste padrão permitirá auxiliar a escolha do agente biológico. Um estudo conduzido por Lazaris *et al.*⁵²⁶, que descreve uma diminuição da densidade microvascular em CRCLM após terapia com bevacizumab em doentes com PC desmoplásico, é muito promissor neste sentido. Os restantes padrões, ao utilizarem mecanismos de cooptação vascular seriam resistentes a estes fármacos – o mecanismo de cooptação vascular é já um processo conhecido de resistência a agentes anti-angiogénicos no carcinoma hepatocelular⁵²⁷.

Ainda no âmbito das terapias dirigidas a alvos moleculares, o estudo de Wu *et al.*⁵²⁸ descreve uma associação entre mutações *PIK3CA* no CRC primário e padrão desmoplásico das CRCLM. Seria muito pertinente averiguar se a metástase hepática apresenta igualmente mutação *PIK3CA*. No contexto de quimioterapia, as mutações do *PIK3CA* têm vindo a ser descritas como mecanismos de resistência aos agentes de primeira linha, através de mecanismos de sobrevivência e proliferação celulares⁵²⁹. As recentes descobertas no carcinoma da mama^{530,531} abriram perspectivas e possibilidades terapêuticas com a utilização de inibidores PI3K⁵³². Racionalizando estes achados, o PC da CRCLM seria, uma vez mais, uma indicação para terapia individualizada, contudo esta linha de pensamento necessita de confirmação.

Nos últimos anos, o desenvolvimento da nanotecnologia tem vindo a ser registado com curiosidade e interesse no campo médico. Os chamados *nanocarriers*, transportadores de fármacos de minúsculas dimensões, poderiam realizar a entrega do fármaco diretamente no local de interesse (tumor), ultrapassando os efeitos colaterais normalmente registados com os agentes convencionais^{533,534}. Os padrões de crescimento podem ter impacto neste campo, uma vez que o padrão desmoplásico poderá representar uma barreira física para estes agentes⁵³⁵, no entanto tal necessitaria de ser confirmado em estudos prospetivos.

Dadas as implicações clínicas relevantes destes padrões de crescimento das metástases hepáticas, será muito interessante e útil, prever de forma eficaz e num contexto pré-cirúrgico. Assim, este conhecimento biológico, resultante da interação tumor-hospedeiro, seria integrado em decisões clínicas em sede de reunião multidisciplinar de decisão terapêutica.

Será lógico e expectável que algumas das características do tumor primário sejam as responsáveis pelo comportamento biológico da metástase hepática e conseqüente padrão de crescimento. Muitos dos doentes com CRC desenvolvem doença metácrona, pelo que o estudo adequado e detalhado do tumor primário poderá ser uma ferramenta valiosa⁵³⁶.

Vários estudos registaram que o CRC também exhibe padrões de crescimento diferentes. Koelzer e Lugli definiram um crescimento de tipo infiltrativo, quando ocorre disseção das estruturas parietais do cólon pelo tumor, e um crescimento do tipo expansivo quando existe uma frente invasiva bem delimitada³⁸⁷. Este achado está em concordância com outros estudos, que identificaram os mesmos padrões, com o padrão infiltrativo a ser associado a doença mais agressiva e a pior prognóstico, e com risco mais elevado de metástases ganglionares linfáticas⁵³⁷⁻⁵⁴¹. Também no tumor primário, este padrão de crescimento representa uma interação tumor-hospedeiro, regulada por alterações moleculares, expansão e invasão tumoral, e diferenças na densidade microvascular⁵⁴². Um estudo de 2007, por Rajaganeshan *et al.*⁵¹², descreveu que um CRC com crescimento expansivo apresentava preferencialmente CRCLM capsuladas, ao

passo que um CRC com padrão infiltrativo exibia CRCLM de limites pouco definidos. Nesta época os critérios para classificação das CRCLM não se encontravam ainda definidos⁴⁷⁸, mas estes achados sugerem uma associação do padrão de crescimento histológico do tumor primário com o secundário. Ainda no estudo de Koelzer e Lugli³⁸⁷, foi descrita no CRC primário uma associação entre mutações do *BRAF* e o padrão infiltrativo, assim como associação entre alterações nas proteínas de reparação do DNA/instabilidade de microssatélites e o padrão expansivo. Esta associação dos padrões de crescimento com características moleculares distintas e específicas fornece evidência de que alterações genéticas desempenham um papel fundamental na dinâmica de crescimento tumoral, com implicações prognósticas e terapêuticas.

Mais recentemente, em 2019, num estudo interessante por parte de Wu *et al.*⁵²⁸, esta associação foi explorada. Numa coorte de 29 doentes com CRC primário e consequente CRCLM, a presença de um padrão expansivo do tumor primário, baixo grau de *tumor budding* e reação inflamatória *Crohn-like* foram associadas a um PC de tipo desmoplásico da CRCLM. Um crescimento infiltrativo do CRC primário, grau intermédio/alto de *tumor budding* e ausência de reação inflamatória *Crohn-like* estavam associadas a um PC do tipo infiltrativo da CRCLM, conforme se retrata nas figuras 52 e 53.

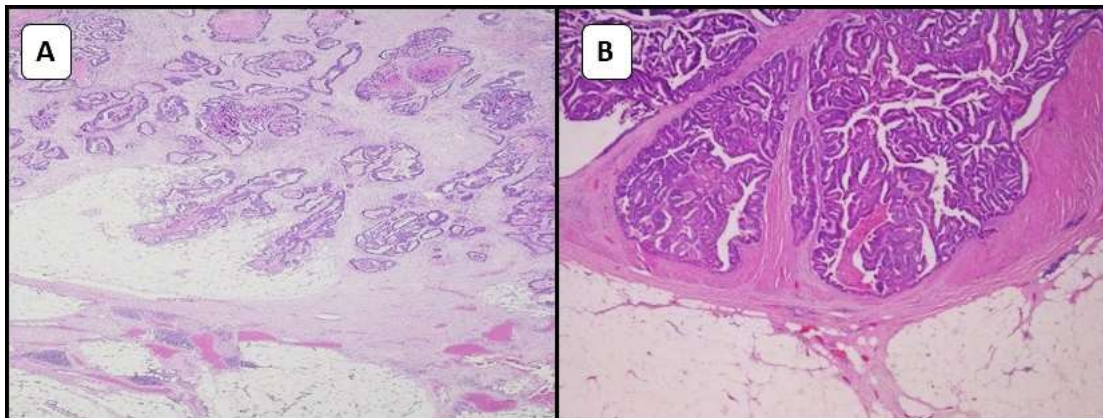


Figura 52. Crescimento infiltrativo do carcinoma colorretal primário, com invasão ampla do tecido adiposo (A), H&E 20x; Crescimento expansivo do carcinoma colorretal primário, com compressão dos tecidos adjacentes (B), H&E 20x.

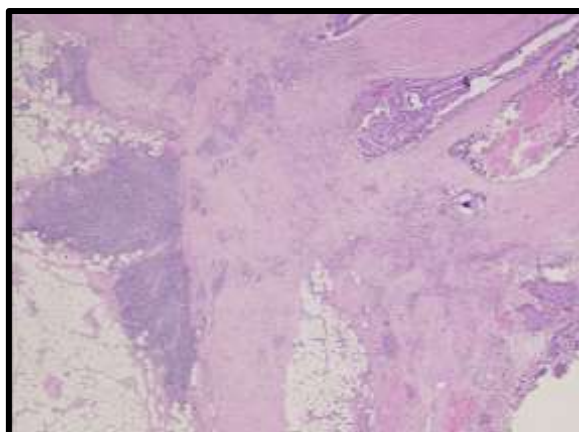


Figure 53. Reação inflamatória *Crohn-like* num carcinoma colorretal, traduzida por agregados linfóides proeminentes evidentes no lado esquerdo da figura, H&E 40x.

Métodos de imagem poderão ser usados para explorar a previsão destas características. Estudos pré-operatórios com recurso a modalidades imagiológicas são obrigatórios em oncologia. A tomografia computadorizada (CT) e a ressonância magnética (MR) com recurso a contraste fornecem informação valiosa sobre o número de nódulos, localização, relações vasculares e parênquima hepático remanescente, auxiliando na decisão cirúrgica.

Neste âmbito, o uso de CT tem providenciado ainda indicadores prognósticos relevantes, nomeadamente na análise da interface tumor-fígado. Dois estudos relataram uma clara delimitação radiológica na interface tumor-parênquima hepático^{543,544}, mas não foi efetuada correlação com o padrão de crescimento histológico. Um estudo recente revelou que o PC de tipo desmoplásico apresenta características de imagem distintas em estudos de CT, tais como margem bem definida e realçada em fase portal, entre o nódulo e o parênquima hepático⁵⁴⁵, com maior sensibilidade utilizando algoritmos de análise de imagem.

A obtenção de imagens utilizando RM com contraste hepato-específico é, atualmente o *gold standard* para avaliação de doentes com CRCLM. Providencia uma sensibilidade acrescida para nódulos de pequenas dimensões, permite a avaliação de lesões hepáticas associadas à quimioterapia e avalia a função hepática pré-operatória⁵⁴⁶⁻⁵⁴⁸. Atendendo ao seu uso rotineiro, e superioridade na avaliação de tecidos moles, a RM com contraste hepato-específico poderá prever com grande precisão o PC de uma CRCLM, tornando-se um marcador de prognóstico não invasivo e pré-operatório. Estudos prospetivos terão de ser conduzidos neste sentido, com integração e validação dos dados de imagem e correlação com os achados histológicos.

Exemplos destes achados podem ser vistos na Figura 54.

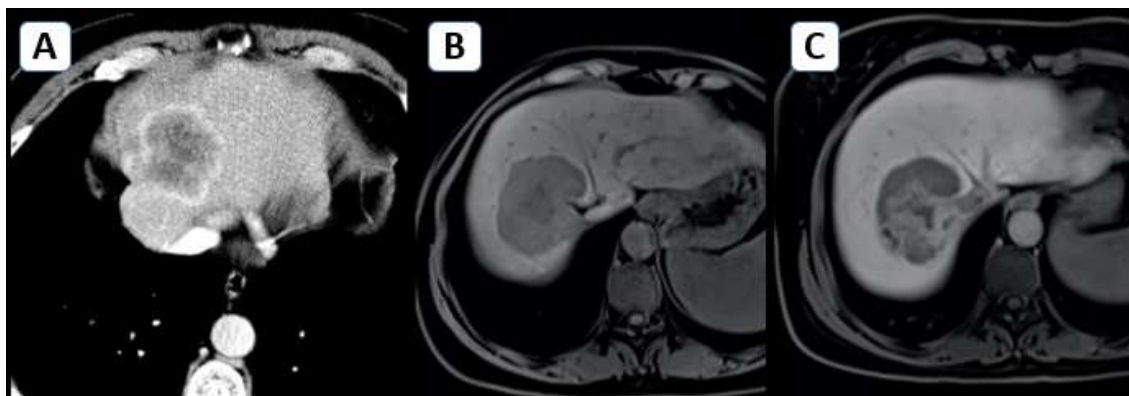


Figura 54. Alterações imagiológicas de padrão de crescimento histológico de uma metástase hepática de carcinoma colorretal (doentes diferentes): A – tomografia computadorizada com contraste em fase venosa portal exibindo um realce periférico em anel, correspondendo à reação desmoplásica; B e C – ressonância magnética, fase T1 com supressão de gordura, antes (B) e 20 minutos após (C) injeção de ácido gadoxético (fase hepatobiliar), demonstrando uma clara retenção intratumoral de contraste, atribuída ao componente desmoplásico. Imagens gentilmente cedidas pelo Professor Doutor Filipe Caseiro Alves.

Um achado interessante dos estudos sobre os padrões de crescimento e CRCLM em doentes com múltiplas metástases, incluindo o efetuado no âmbito desta dissertação, é que a maioria dos nódulos exibem o mesmo padrão⁵⁴⁹, reforçando a teoria de que o PC é o resultado fenotípico de uma interação tumor-hospedeiro. Tendo isto em consideração, será expectável que em hepatectomias subsequentes, o PC está igualmente sobreponível. O estudo de Galjart *et al.*⁴⁸⁰ comparou o PC da primeira hepatectomia com o da segunda hepatectomia, numa coorte de 66 doentes, e observou, na globalidade, uma manutenção do padrão. Este achado poderá ser útil na seleção correta de doentes para uma segunda hepatectomia, ou modulação terapêutica de acordo com o PC identificado na primeira metástase.

Atualmente os doentes são selecionados para segunda hepatectomia em sede de reunião multidisciplinar de decisão terapêutica, com base do *status* do doente e resposta à quimioterapia. No correto contexto uma segunda, e mesmo terceira, hepatectomia é considerada exequível e segura^{550–552}. A possibilidade de prever o padrão de crescimento, com base nos resultados da hepatectomia prévia, permitirá a seleção do melhor agente neoadjuvante, mais concretamente com o uso de anti-angiogénicos nos doentes com PC de tipo desmoplásico.

No que diz respeito à avaliação dos doentes com CRCLM, estas raramente são biopsadas, sendo maioritariamente definidas e caracterizadas por técnicas de imagem⁵⁵³; no entanto, em alguns casos, uma lesão hipervascular, nomeadamente um hemangioma, especialmente a sua variante esclerótica, poderá afigurar-se um desafio diagnóstico e uma biópsia afigurar-se-á como necessária⁵⁵⁴. Nestas circunstâncias, o material obtido representa uma oportunidade valiosa para análise de biomarcadores, mais concretamente o estudo de mutações *RAS*⁵⁵⁵, mas também poderá adicionar conhecimento relativamente aos padrões de crescimento.

Embora, o padrão de crescimento não possa ser determinado em biópsia⁴⁷⁸, esta pode fornecer informação pertinente. Em 2012, Eefsen *et al.*²⁵⁸, estudaram 24 CRCLM e identificaram um aumento de expressão do recetor ativador do plasminogénio, de tipo urocinase – do inglês *urokinase-type plasminogen activator receptor* (uPAR), em metástases com padrão desmoplásico. A expressão de uPAR tem vindo a ser associada a ativação de vias celulares específicas, em vários tipos de tumores e não apenas em CRC, e poderá representar um alvo terapêutico^{556,557}. O mesmo grupo, em 2015, numa coorte de 254 CRCLM, confirmou essa expressão aumentada de uPAR em metástases com padrão desmoplásico, e identificou ainda uma expressão aumentada de CD68 em doentes submetidos a quimioterapia; verificou-se também uma expressão diminuída de CD3 em padrões de tipo misto e não se observaram diferenças em doentes não submetidos a quimioterapia neoadjuvante²⁵⁹.

Estes achados são potencialmente extrapolados para uma biópsia, e a caracterização da população imune poderá desempenhar um papel adicional visto que prevê a resposta aos denominados inibidores dos *checkpoints* imunes³⁷⁶. O PC de tipo desmoplásico é caracterizado por uma expressão aumentada de genes relacionados com imunidade, nomeadamente *CD8A* (do inglês, *Cluster of Differentiation 8a*), *CD8B* (do inglês, *Cluster of Differentiation 8b*), *GZMA* (do inglês, *Granzyme A*), *GZMB* (do inglês, *Granzyme B*) e *PRF1* (do inglês, *Perforin 1*), quando comparados com o PC de tipo infiltrativo⁵⁵⁸, representando por isso um biomarcador valioso para terapia imunomoduladora.

A análise detalhada da composição do infiltrado imune e da expressão génica permitirá uma caracterização adequada do microambiente tumoral, com quantificação de níveis de citocinas, libertadas por células tumorais e fibroblastos associados ao tumor⁵⁵⁹. O papel dos macrófagos nas metástases tumorais é igualmente importante. Uma mudança do fenótipo M2 (pró-tumoral) para um fenótipo M1 (anti-tumoral) induz normalização vascular e estimula respostas imunes antineoplásicas⁵⁶⁰. Há vários estudos sobre o papel das citocinas no CRC. Numa revisão efetuada por Bazzichetto⁵⁶¹, altos níveis de interleucina 8 (IL-8) estão associados a progressão de doença e a metástases hepáticas, bem como mutações *BRAF* e *PTEN*. Em 2019, uma revisão sobre microambiente tumoral e organotropismo metastático, levada a cabo por Pretzch *et al.*¹⁶¹, salienta o papel do microRNA (miRNA). Os níveis de determinados miRNA estavam ligados à disseminação do CRC para órgãos específicos, nomeadamente aumento da expressão de miRNA-31-5p e existência de metástases peritoneais, com níveis mais baixos do mesmo miRNA e a presença de metástases hepáticas. Seria interessante verificar se existe uma associação entre um miRNA e um PC específico, permitindo a sua determinação serológica.

O estudo das diferenças na vascularização dos vários PC tem sido alvo de caracterização. Em 2018, Lazaris *et al.*⁵²⁶ demonstraram uma maior densidade microvascular no padrão infiltrativo, quando comparado com o padrão desmoplásico, a

nível da interface tumor-parênquima hepático. No padrão infiltrativo, estes vasos eram contínuos com a vascularização sinusoidal, comprovando um mecanismo de cooptação vascular e, no padrão desmoplásico, eram contínuos com as arteríolas, representando angiogênese. Estes achados podem ser replicados numa biópsia, desde que exista representação de tecido não tumoral. Um achado interessante neste estudo foi que, quando analisada a densidade microvascular do tumor, esta era inferior nos doentes com padrão desmoplásico após tratamento com bevacizumab, reforçando o papel deste agente no tratamento de CRCLM e a necessidade de prever o padrão para uma decisão terapêutica personalizada. Em consonância, Ibrahim *et al.*⁵⁶², descrevem que a expressão de angiopoietina 1, associada com mecanismos de cooptação vascular, está expressa em maiores quantidades em hepatócitos adjacentes à CRCLM de padrão infiltrativo, mesmo após tratamento com quimioterapia e / ou bevacizumab.

De forma complementar a estes achados, Stremitzer *et al.*⁵⁶³ estudaram uma coorte de 118 doentes e verificaram uma associação entre PC desmoplásico e comportamento angiogénico, com um fenótipo imune inflamatório, ou seja, mais ativo, sugerindo que o padrão de crescimento de CRCLM não seja apenas um biomarcador para terapias com bevacizumab, mas também para tratamentos imunomoduladores.

Outros marcadores têm sido descritos no CRC associados com angiogênese e hipoxia, nomeadamente expressão dos fatores indutores da hipoxia^{564,565} e da anidrase carbónica^{566,567}. Estes marcadores têm potencial para serem aplicados em biópsias.

Nos últimos anos, a biópsia líquida tem emergido e ganho interesse no âmbito do CRC²⁴¹. O seu principal papel é provavelmente a determinação do *status RAS* em doentes em estágio IV, quando tecido não está disponível, com uma concordância líquido-tecido de cerca de 90%²⁴⁰. Terá também uma função importante na monitorização e *follow-up* de doentes com CRC sem mutações *RAS* (*wild type*), ao ser capaz de diagnosticar mudanças dinâmicas do *status RAS*⁵⁶⁸. Integrando os achados de Wu *et al.*⁵²⁸, mutações específicas tais como *PIK3CA* podem ser caracterizadas por biópsia líquida e relacionadas como o PC das CRCLM. Esta correlação representaria uma informação importante, obtida de forma menos invasiva, especialmente em doentes submetidos a cirurgia noutra instituição e cuja informação que pudesse prever o PC estivesse inacessível ou fosse difícil de obter.

Os padrões de crescimento têm granjeado interesse crescente da comunidade científica e surgem estudos em outros órgãos parenquimatosos. O pulmão é o segundo local mais comum de metástases de CRC, contabilizando cerca de 33% de todas as metástases de CRC, especialmente em doentes com cancro do reto⁵⁶⁹. Assim, há um potencial para a aplicação dos padrões de crescimento histológicos no pulmão e consequente implicação clínica. Em 2017, Welter *et al.*⁵⁷⁰ caracterizaram 459 metástases pulmonares de diferentes origens e observaram diferentes padrões histológicos: pseudocápsula, crescimento intersticial, difusão aerogénica de células

tumorais (do inglês, *aerogenous spread of floating cancer cell clusters – ASFCs*), crescimento pleural, perivascular, entre outros. É descrito que as metástases pulmonares de CRC e de outros tumores epiteliais exibem mais frequentemente ASFCs, quando comparados com metástases de melanoma e sarcoma recomendando, por isso, nos primeiros uma ressecção cirúrgica com margem mais alargada e circular.

Este assunto foi novamente abordado em 2018, por Yeong *et al.*⁵⁷¹ numa coorte de 92 doentes submetidos a ressecção parenquimatosa pulmonar por metástases de CRC. Neste estudo são descritos três diferentes padrões de crescimento histológicos, dois deles similares aos hepáticos: 1) um padrão expansivo, com compressão do parênquima pulmonar adjacente; 2) um padrão desmoplásico, com uma banda de fibrose contendo linfócitos, na interface do tumor com o tecido pulmonar não tumoral; e 3) um padrão aerogéneo, no qual as células tumorais, isoladas ou em pequenos agregados / ninhos, se difundem pelos espaços alveolares, sem interrupção da arquitetura pulmonar e com ausência de infiltrado inflamatório, de forma análoga ao padrão infiltrativo observado nas CRCLM⁵⁵⁸, conforme se verifica na figura 55.

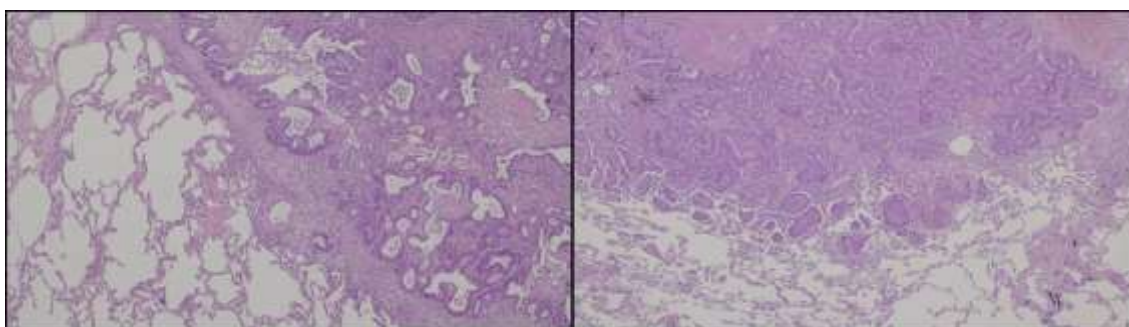


Figura 55. Representação de dois padrões histológicos de metástases pulmonares por carcinoma colorretal: padrão desmoplásico com pseudocápsula fibrosa na interface tumor – parênquima não tumoral (à esquerda), H&E 100x; padrão aerogéneo com escassa resposta inflamatória e disseminação tumoral nos espaços aéreos alveolares (à direita), H&E 40x.

Estes achados tiveram significado clínico. As metástases com padrão aerogéneo apresentavam tamanho inferior às restantes, mas foram associadas a pior prognóstico com mais risco biológico e menor sobrevivência global. Mesmo num órgão diferente, os padrões de crescimento surgem como um fator autoritário de prognóstico e, uma vez mais, com necessidade de previsão pré-operatória. No estudo de Yeong *et al.*⁵⁷¹, o padrão aerogéneo ocorreu mais em doentes com CRC do reto, no entanto, esta associação não teve significado estatístico; apesar disso, isto pode sugerir que o local de origem do tumor tem implicações do padrão histológico da metástase, podendo ser um fator extra a considerar.

As metástases cerebrais também entram nestas equações, sendo o tumor mais comum do sistema nervoso central⁵⁷². Poucos fatores de prognóstico são conhecidos, sendo os mais comuns o número e o tamanho das lesões, assim como a história de quimioterapia prévia⁵⁷³. Nos CRC, as metástases cerebrais ocorrem em cerca de 3,2% dos doentes, com complicações severas⁵⁷⁴. Em 2013, Berghoff *et al.*⁵⁷⁵ efetuou um

estudo em 57 cérebros de autópsia, de diferentes tumores primários e demonstrou três diferentes padrões microscópicos: 1) um crescimento bem demarcado do parênquima cerebral; 2) um padrão de opção co-vascular; e 3) um padrão com infiltração difusa do parênquima adjacente. Havia concordância entre os padrões das várias metástases do mesmo doente e as metástases de melanoma exibiam mais frequentemente um mecanismo de co-opção vascular. Os padrões de crescimento refletem diferentes interações tumor – parênquima não tumoral, com detecção de níveis aumentados de integrinas $\alpha_v\beta_6$ no grupo com padrão bem demarcado. O padrão de crescimento das metástases cerebrais pode ser difícil de avaliar em ressecções cirúrgicas devido à fragmentação, e o seu impacto na sobrevivência global não pode ser determinado em estudos necrópsicos, mas de forma similar aos outros órgãos, poderá ser previsto em exames de imagem⁵⁷⁶ e guiar decisões terapêuticas.

Uma vez mais as limitações do nosso estudo prendem-se com a natureza retrospectiva e uni institucional das coortes clínicas.

No que diz respeito à coorte de doentes com GCLM a população em estudo é pequena e o longo período de tempo determina sempre diferenças técnicas na abordagem cirúrgica do tumor primário e das metástases hepáticas, bem como nos métodos de detecção imagiológicos, estadiamento tumoral e heterogeneidade no que diz respeito a agentes de NAC. No CHUC recomenda-se NAC como abordagem complementar para cura nestes doentes. Poderá ainda ter existido alguma discrepância no acesso a tomografia por emissão de positrões, a ressonância magnética nuclear e a laparoscopia de estadiamento.

Finalmente, tanto na coorte de doentes com GCLM como na coorte de doentes com CRCLM, o tratamento de tumor primário nem sempre foi efetuado no CHUC, pelo que os princípios de tratamento e vigilância podem ter sido diferentes dos que aplicamos, apresentando provável implicação no *timing* da hepatectomia e respetivos tempos de OS.

3. Modelo animal

A ideia de utilizar modelos animais com recurso a estomas para o estudo de CRC não é propriamente uma novidade, tendo sido utilizada pela primeira vez em 1994, em ratos Fisher⁵⁷⁷. Neste estudo os animais foram sujeitos a uma dupla colostomia no cólon transversos e depois tratados com 1,2-dimetilhidrazina e acetato de metilazoximetanol com posterior estudo histológico das lesões – 48,1% foram classificados como adenomas e 51,9% como adenocarcinomas⁵⁷⁸.

Em 2009 foi apresentado um modelo de CRC, em murganhos atímicos Balb/c submetidos a cirurgia com criação de um estoma no cego, com subsequente implantação de fragmentos tumorais obtidos de animais da mesma espécie previamente inoculados no dorso, a nível subcutâneo, com células tumorais com mutação no gene MSH2, correspondentes à linha celular LoVO⁵⁷⁹. No entanto não existem modelos de CRC na porção do cólon sigmoide, principalmente porque a implantação das células tumorais no cólon distal ou reto é acompanhada de rápido crescimento tumoral com desenvolvimento de obstrução intestinal. Esta obstrução intestinal determina a morte precoce do animal, maioritariamente antes do desenvolvimento de estádios avançados de doença, conforme se verifica nos modelos ortotópicos transanais de CRC^{580,581}.

Neste trabalho descrevemos melhorias evidentes do modelo ortotópico de CRC do cólon sigmoide, baseado no trabalho descrito em 2012³⁴⁹, através de uma colostomia descendente com fístula cutâneo-mucosa do cólon sigmoide. Embora se trate de um modelo cirúrgico, a baixa taxa de mortalidade e a rápida recuperação do animal, tornam este modelo reprodutível e fiável, apresentando vantagens quando comparado com os descritos na literatura^{577,579}. Neste modelo é possível a indução de CRC utilizando linhas celulares tumorais e apresenta o potencial de se poder utilizar fragmentos tumorais provenientes de dadores humanos. Para além disto possibilita o desenvolvimento de CRC no cólon sigmoide e monitorização através da observação do seu desenvolvimento, apresentando ainda características de invasão local que poderão representar uma via para o desenvolvimento de lesões secundárias, situação que não ocorre em praticamente nenhum dos modelos de CRC disponíveis.

Assim, e dados os resultados obtidos, verificou-se que nos animais inoculados com a linha celular WiDr, o desenvolvimento de CRC foi mais agressivo, especialmente quando inoculados a nível da colostomia distal, com desenvolvimento de invasão neural, abrindo caminho a uma via metastática importante. Isto pode ser explicado pela elevada expressão de VEGF na periferia tumoral, mas também pela expressão de CD44 nos implantes neurais, conforme observado no nosso trabalho, traduzindo um papel ativo das CSC na invasão local e disseminação à distância. A elevada expressão de VEGF e de CD44 foi apenas identificada na linha celular WiDr, linha essa que se mostrou mais

resistência à morte celular induzida por células NK, características que podem explicar a sua maior agressividade.

O desenvolvimento de metástases constitui uma característica importante na escolha dos modelos animais de cancro, visto que a maioria dos carcinomas se apresenta em estágio avançado aquando do diagnóstico e, por isso, a procura de um modelo que mimetize o que acontece no humano. As metástases com compromisso de órgãos vitais determinam o curso clínico da doença e a morte na maioria dos doentes. Nesta perspetiva, um bom modelo de CRC deverá replicar a morfologia e o desenvolvimento de metástases para os gânglios linfáticos locorregionais, fígado e pulmão, mas também deverá exibir atributos de invasão local, ou seja, invasão linfovascular e invasão neural.

O local de inoculação das células tumorais pode alterar a sensibilidade a agentes terapêuticos, de forma reversível, sugerindo uma interação importante entre as células tumorais e o microambiente tumoral. Deste modo, os modelos subcutâneos não se afiguram como a melhor opção para a seleção de agentes terapêuticos⁵⁸²⁻⁵⁸⁸.

Com o modelo que realizámos foi possível observar infiltração tumoral local, com compromisso das diferentes túnica parietais do cólon, bem como invasão neural, característica comum no CRC e representando doença avançada. Os animais que desenvolveram tumores primários exibiram um padrão morfológico similar à doença humana, o que associado aos atributos de invasão local reforçam a ideia de que este modelo é um modelo fidedigno para o estudo de CRC a nível da região distal do cólon, com ênfase na importância do microambiente tumoral. Ressalva-se ainda que nos animais inoculados com a linha tumoral C2BBE1, embora não se tenha identificado invasão neural nem doença metastática, foi possível visualizar morfologias peculiares, nomeadamente mucinosa e micropapilar, conhecida pela sua agressividade⁴⁹.

Os estudos de imagem com recurso a ^{99m}Tc-MIBI revelaram uma captação heterogénea, o que pode estar relacionado com a presença de necrose tumoral, já que os tumores com maior percentagem de necrose no estudo histológico foram aqueles que exibiram menor captação do radiofármaco.

Os modelos animais são uma ferramenta útil e frequentemente utilizada no estudo em oncologia. Por forma a terem uma eficiência adequada, um modelo animal deverá cumprir um requisito fundamental – ser similar à doença humana. A maioria dos modelos animais tem uma baixa frequência de metástases hepáticas⁵⁸⁹ e nenhum dos modelos animais descritos até à data exibe um padrão de crescimento desmoplásico nas metástases hepáticas, a não ser que ocorra modificação genética da linha tumoral²⁶⁷. Este facto é uma limitação *major* no uso dos modelos animais no estudo dos padrões de crescimento.

Não obstante, no nosso trabalho introduzimos uma nova e melhorada abordagem do modelo ortotópico de CRC previamente descrito, utilizando um roedor diferente – o rato, e três linhas celulares de CRC, com origem e características morfológicas e funcionais distintas, capazes de gerar aspectos histológicos diferentes, mas também com capacidade de indução de invasão neural, de forma semelhante ao que acontece no humano. Este modelo poderá ser utilizado para compreensão dos mecanismos moleculares *in vivo* e comportamento dos CRC retossigmoides, e elucidar os mecanismos de metástase, a causa principal de morte em doentes com CRC. Embora não se tenha registado desenvolvimento de metástases hepáticas, a semelhança histológica com a doença humana é notável, com observação de infiltração tumoral local, invasão das túnicas parietais do cólon e invasão neural – uma via metastática importante e traduzindo agressividade tumoral. Estas características reforçam a capacidade deste modelo para o estudo do CRC a nível retossigmoide. Para além disto, a morfologia das lesões foi sobreponível à observada e descrita para o ser humano, replicando o adenocarcinoma convencional, mas também a diferenciação mucinosa e micropapilar – morfologias peculiares e com comportamentos biológicos próprios⁴⁹. Possivelmente com o uso de diferentes linhas celulares, o modelo poderá apresentar metástases hepáticas com os diferentes padrões de crescimento.

O modelo permitiu ainda assinalar a importância de mecanismos responsáveis por maior agressividade do CRC a nível clínico, como é o caso da sobre-expressão de VEGF e de CD44 nos tumores induzidos pela linha celular WiDr e que manifestaram invasão neural, traduzindo um efeito importante das células tumorais cancerígenas e da angiogénese, na metastização. Curiosamente, esta linha celular foi também aquela que nos estudos *in vitro*, demonstrou maior resistência à morte celular induzida por células NK – células imunes presentes nestes animais, e que poderá estar relacionada com a sua maior agressividade.

Adicionalmente, este modelo ortotópico poderá funcionar como um modelo pré-clínico, com translação dos resultados potenciais, observados muitas vezes *in vitro*, mas raramente eficazes quando aplicados a doentes. O modelo representa uma solução fácil e reprodutível, ultrapassando a maioria das limitações presentes nos modelos existentes de CRC. A inoculação das células tumorais no local de interesse é um fator essencial, pois permitirá reproduzir, o máximo possível, a interação tumor e microambiente tumoral observada no humano. Tal não acontece nos modelos subcutâneos, limitando a sua utilidade como modelos de seleção de agentes terapêuticos^{582–588}.

Nos últimos anos vários tipos de modelos animais, utilizando ratos e ratinhos, têm sido desenvolvidos para o estudo do CRC. Na era da sequenciação e manipulação genética, parecia que os modelos geneticamente modificados fossem os melhores para essa tarefa, mas apresentam grandes limitações para o estudo do processo metastático e para fases avançadas da doença. A adição de novas tecnologias de edição

genética, nomeadamente a tecnologia CRISPR-Cas9, especialmente quando associada com organoides de CRC⁵⁹⁰, poderá ser promissora nesse sentido, no entanto, não é uma ferramenta disponível na maioria dos laboratórios.

Cada modelo animal tem as suas vantagens e desvantagens e, em alguns casos, mais do que uma forma de indução de CRC é necessária⁵⁹¹. O modelo deverá ser escolhido de acordo com o tipo de estudo, mais concretamente as suas expectativas e objetivos, por forma a maximizar o seu potencial⁵⁹².

Assim, dos modelos atualmente disponíveis, o modelo ortotópico parece estar na liderança para a investigação em cancro, pois permite o estudo detalhado do microambiente *in vivo* e das etapas que conduzem ao desenvolvimento de metástases. Devido às diferentes características dos segmentos cólicos, a criação e desenvolvimento de um modelo para o estudo da carcinogénese do cólon esquerdo é de uma elevada importância e apresenta uma solução para as limitações técnicas de outros modelos.

A demanda por investigação translacional em CRC está a aumentar, com necessidade de modelos apropriados para análise das interações complexas *in vivo*. A aplicação do modelo aqui proposto para o estudo da carcinogénese de tumores retosigmoides será um auxílio precioso nesse sentido. A sua exequibilidade técnica, baixa mortalidade, rápida recuperação e facilidade de inoculação de células ou tecido tumoral será sem dúvida uma mais-valia, com clara vantagem sobre os modelos descritos na literatura^{577,579}. O modelo apresenta ainda a possibilidade de monitorização do desenvolvimento tumoral com recurso a técnicas de medicina nuclear, nomeadamente, com estudos com ^{99m}Tc-MIBI.

Será interessante ver o comportamento do modelo quando utilizadas outras linhas celulares que não as descritas neste manuscrito, nomeadamente linhas mais agressivas e com potencial metastático – HCT116 e SW620⁵⁹³, bem como utilizar enxertos derivados de doentes humanos^{311,594}, e observar as alterações morfológicas nestes animais, sempre comparado com o que acontece no humano.

Capítulo VII

Conclusões e perspectivas futuras



Ao longo dos diferentes capítulos desta Tese foram descritos, interpretados e discutidos os resultados obtidos, visando a caracterização do papel do microambiente tumoral e a sua influência no carcinoma colorretal primário e secundário.

Nos capítulos V e VI, foi possível visualizar os resultados de ambas as vertentes, as componentes clínica e pré-clínica, bem como efetuar a sua discussão, retirando implicações clínicas e ideias a desenvolver no futuro.

Foi possível averiguar alterações profundas do microambiente tumoral em doentes com imunossupressão induzida devido a transplantação hepática e/ou renal, e as alterações fenotípicas das metástases hepáticas, expressas pelo seu padrão de crescimento, correspondendo a mecanismos biológicos distintos e tradutores de interações diferentes, conforme descrito no componente clínico deste estudo.

Na constituinte pré-clínica, desenhada com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos na vertente clínica, foi evidenciado o papel do modelo animal no estudo das doenças humanas, com reprodução da fisiopatologia humana e desenvolvimento de uma via metastática importante, mais concretamente de invasão neural.

Desta forma, neste último capítulo, serão destacadas as conclusões de maior importância. Ressalva-se ainda que o estudo deste tema não se encontra esgotado no âmbito desta Tese, pelo que serão ainda enunciadas as perspetivas futuras mais relevantes.

No que concerne a conclusões destacam-se:

1. O carcinoma colorretal desenvolvido após transplante hepático e/ou renal apresentou alterações profundas do seu microambiente, com provável relação com o *status* de imunossupressão.
2. A maior agressividade do carcinoma colorretal pós-transplante refletiu-se nas características histológicas, como elevada percentagem de necrose, menor atividade imune, ausência de células *natural killer*, maior expressão de marcadores de *cancer stem cells* e inexistência de expressão de PD-L1, limitando as terapêuticas alvo, nestas situações.
3. A presença de instabilidade de microssatélites poderá representar um alvo terapêutico valioso nestes doentes.
4. A cirurgia hepática é o *gold standard* para o tratamento de metástases hepáticas, com ou sem quimioterapia associada, e as características histológicas revelaram influência, quer em termos de sobrevivência global, quer em sobrevivência livre de doença.
5. O padrão de crescimento histológico surgiu como fator de prognóstico reprodutível, com claras implicações, quer no prognóstico, quer na terapêutica dos doentes submetidos a ressecção de metástases hepáticas.
6. Estes padrões de crescimento histológicos são o resultado fenotípico de uma interação tumor/parênquima não tumoral.

7. O padrão de crescimento histológico desmoplásico exibiu um efeito favorável, representando uma tentativa de contenção tumoral pelo hospedeiro.
8. Os padrões de crescimento histológicos não desmoplásicos, ou seja, padrão expansivo e infiltrativo, são padrões com pior prognóstico, tendo-se verificado, neste trabalho, uma associação significativa entre padrão expansivo e pior sobrevivência.
9. Tanto as metástases hepáticas de carcinoma colorretal como as metástases hepáticas de carcinoma gástrico exibiram os mesmos tipos de padrões de crescimento histológicos, com prognósticos similares para cada tipo, reforçando o papel dessa interação tumor/hospedeiro.
10. Cada padrão de crescimento histológico apresentou implicações clínicas distintas, pelo que deverão fazer parte das reuniões multidisciplinares de decisão terapêutica.
11. O valor dos padrões de crescimento histológicos terá ainda mais impacto se for possível a sua previsão num contexto pré-operatório.
12. O modelo animal proposto com recurso a de colostomia descendente com fístula cutâneo-mucosa do cólon sigmoide é exequível e reprodutível.
13. Este modelo permitiu uma reprodução locorregional do comportamento de carcinomas colorretais humanos, retratando a morfologia e mecanismos de invasão, tal como invasão neural.
14. Foi possível a monitorização do crescimento tumoral por técnicas não invasivas, nomeadamente com recurso a técnicas de medicina nuclear.
15. Observou-se que, após inoculação das células tumorais, o modelo recriou o comportamento registado nos estudos *in vitro*, com as células da linha celular de maior agressividade, mais concretamente a linha WiDr, a exibir comportamento mais agressivo.
16. O modelo permitiu ainda o estudo detalhado de características imuno-histoquímicas associadas a maior agressividade, nomeadamente sobre-expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e marcadores de *cancer stem cells*.
17. O modelo ultrapassou a maioria das limitações existentes nos restantes modelos animais de carcinoma colorretal e, sendo um modelo ortotópico, poderá funcionar como um modelo pré-clínico eficaz e permitir translação de resultados pré-clínicos.

De acordo com o trabalho desenvolvido, este estudo representa um contributo inovador na área do carcinoma colorretal.

O efeito do microambiente tumoral no carcinoma colorretal é um fator de amplo interesse, e a sua compreensão e modulação terapêutica será fundamental para uma terapia individualizada.

Assim, e de acordo com os resultados obtidos, esta Tese levanta algumas questões a serem esclarecidas em estudos futuros, mais concretamente:

1. Previsão dos padrões de crescimento histológicos de metástases hepáticas de carcinoma colorretal, possibilitando a sua identificação num contexto pré-operatório, auxiliando assim na seleção criteriosa de doentes para cirurgia e seleção de fármacos adequados. Para este efeito, várias estratégias seriam exequíveis, tais como: a) estudo detalhado das características patológicas e moleculares do carcinoma colorretal primário, com identificação de marcadores associados a um padrão de crescimento específico; b) estudo imuno-histoquímico e molecular das metástases visando, uma vez mais, a associação com determinado padrão de crescimento histológico e possibilitando a sua identificação em biópsia; c) caracterização detalhada do microambiente imune, com quantificação da população linfocitária e sua atividade, correlacionando a existente a nível sérico com um padrão de crescimento histológico específico, permitindo uma determinação sérica do padrão; d) utilização de metodologias de imagem, com recurso a algoritmos de inteligência artificial, tornando possível a identificação radiológica pré-operatória dos padrões.
2. Adaptação dos padrões de crescimento histológicos a outras metástases hepáticas, nomeadamente metástases hepáticas de carcinoma da mama e de carcinoma pancreatobiliar.
3. Estudo dos padrões de crescimento das metástases de tumores sólidos em outros órgãos parenquimatosos. Sendo o pulmão o segundo local mais frequente de metástases de carcinoma colorretal, seria interessante a avaliação dos padrões de acordo com o estipulado na literatura e a correlação com a sobrevivência.
4. Será interessante ver o comportamento do modelo animal descrito quando utilizadas outras linhas celulares que não as descritas neste manuscrito, nomeadamente linhas mais agressivas e com potencial metastático – HCT116 e SW620, bem como utilizar enxertos derivados de doentes humanos, e observar as alterações morfológicas nestes animais, sempre comparando com o que acontece no humano.

Parte III

REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Reprint of: Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*. 2015;49(6):1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2015.05.004
2. Siegel RL, Miller KD JA. Cancer Statistics , 2017. *CA Cancer J Clin*. Published online 2017. doi:10.3322/caac.21254.
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;66(4):683-691. doi:10.1136/gutjnl-2015-310912
4. Woodage T, King SM, Wacholder S, Hartge P, Struewing JP, McAdams M, Laken SJ, Tucker MA, Brody LC. The APC I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi jews. *Nature Genetics*. Published online 1998. doi:10.1038/1722
5. Gershon Y, Lynch H. Genetic factors and colorectal cancer in Ashkenazi Jews. *Familial Cancer*. 2004;3(3-4):215-221. doi:10.1007/s10689-004-9547-x
6. Murphy G, Devesa SS, Cross AJ, Inskip PD, McGlynn KA, Cook MB. Sex disparities in colorectal cancer incidence by anatomic subsite, race and age. *International Journal of Cancer*. Published online 2011. doi:10.1002/ijc.25481
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
8. Accessed October 1, 2019. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>
9. Bosetti C, Levi F, Rosato V, Bertuccio P, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe. *International Journal of Cancer*. Published online 2011. doi:10.1002/ijc.25653
10. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, e Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The Lancet Oncology*. Published online 2008. doi:10.1016/S1470-2045(08)70179-7
11. Wong MC, Ding H, Wang J, Chan PS, Huang J. Prevalence and risk factors of colorectal cancer in Asia. *Intestinal Research*. Published online 2019. doi:10.5217/ir.2019.00021
12. Isbister WH. COLORECTAL CANCER BELOW AGE 40 IN THE KINGDOM OF SAUDI ARABIA. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*. Published online 1992. doi:10.1111/j.1445-2197.1992.tb07227.x
13. Bishehsari F, Mahdavinia M, Vacca M, Malekzadeh R, Mariani-Costantini R. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. *World Journal of Gastroenterology*. Published online 2014. doi:10.3748/wjg.v20.i20.6055
14. Karsa L V., Lignini TA, Patnick J, Lambert R, Sauvaget C. The dimensions of the CRC problem. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. Published online 2010. doi:10.1016/j.bpg.2010.06.004

15. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. Published online 2016. doi:10.1093/bmb/64.1.1
16. Haggard FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. Published online 2009. doi:10.1055/s-0029-1242458
17. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*. Published online 2010. doi:10.1007/DCR.0b013e3181d60a51
18. Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. Published online 2015. doi:10.1053/j.gastro.2014.12.035
19. Namasivayam V, Lim S. Recent advances in the link between physical activity, sedentary behavior, physical fitness, and colorectal cancer. *F1000Research*. Published online 2017. doi:10.12688/f1000research.9795.1
20. Robsahm TE, Aagnes B, Hjartåker A, Langseth H, Bray FI, Larsen IK. Body mass index, physical activity, and colorectal cancer by anatomical subsites: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *European Journal of Cancer Prevention*. Published online 2013. doi:10.1097/CEJ.0b013e328360f434
21. Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Ogino S, Kirkner GJ, Chan AT, Willett W, Fuchs CS. Physical activity and male colorectal cancer survival. *Archives of Internal Medicine*. Published online 2009. doi:10.1001/archinternmed.2009.412
22. Ortiz AP, Thompson CL, Chak A, Berger NA, Li L. Insulin resistance, central obesity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer*. Published online 2012. doi:10.1002/cncr.26454
23. Becker S, Dossus L, Kaaks R. Obesity related hyperinsulinaemia and hyperglycaemia and cancer development. *Archives of Physiology and Biochemistry*. Published online 2009. doi:10.1097/LGT.0b013e3182449bc1
24. Fenton JI, Hord NG, Lavigne JA, Perkins SN, Hursting SD. Leptin, insulin-like growth factor-1, and insulin-like growth factor-2 are mitogens in ApcMin/+ but not Apc+/+ colonic epithelial cell lines. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. Published online 2005. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0916
25. Endo H, Hosono K, Uchiyama T, Sakai E, Sugiyama M, Takahashi H, Nakajima N, Wada K, Takeda K, Nakagama H, Nakajima A. Leptin acts as a growth factor for colorectal tumours at stages subsequent to tumour initiation in murine colon carcinogenesis. *Gut*. Published online 2011. doi:10.1136/gut.2010.235754
26. VanSaun MN. Molecular pathways: Adiponectin and leptin signaling in cancer. *Clinical Cancer Research*. Published online 2013. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0930
27. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*. Published online 2010. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.058
28. Yehuda-Shnaidman E, Schwartz B. Mechanisms linking obesity, inflammation and altered metabolism to colon carcinogenesis. *Obesity Reviews*. Published online 2012. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01024.x
29. Waldner MJ, Foersch S, Neurath MF. Interleukin-6 - A key regulator of colorectal cancer development. *International Journal of Biological Sciences*. Published online 2012. doi:10.7150/ijbs.4614

30. Zeng J, Tang ZH, Liu S, Guo SS. Clinicopathological significance of overexpression of interleukin-6 in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. Published online 2017. doi:10.3748/wjg.v23.i10.1780
31. Ayers D, Boughanem H, Macías-González M, Weygant N. Epigenetic Influences in the Obesity/Colorectal Cancer Axis: A Novel Theragnostic Avenue. *Journal of Oncology*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/7406078
32. Sinha R. An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Published online 2002. doi:10.1016/S0027-5107(02)00166-5
33. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: A review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutrition and Cancer*. Published online 2008. doi:10.1080/01635580701684872
34. Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Pelli MA, Morozzi G. Genotoxic effect of bile acids on human normal and tumour colon cells and protection by dietary antioxidants and butyrate. *European Journal of Nutrition*. Published online 2008. doi:10.1007/s00394-008-0725-8
35. Bastide NM, Chenni F, Audebert M, Santarelli RL, Taché S, Naud N, Baradat M, Jouanin I, Surya R, Hobbs DA, Kuhnle GG, Raymond-Letron I, Gueraud F, Corpet DE, Pierre FHF. A central role for heme iron in colon carcinogenesis associated with red meat intake. *Cancer Research*. Published online 2015. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2554
36. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ (Online)*. Published online 2011. doi:10.1136/bmj.d6617
37. Wu QJ, Yang Y, Vogtmann E, Wang J, Han LH, Li HL, Xiang YB. Cruciferous vegetables intake and the risk of colorectal cancer: A meta-analysis of observational studies. *Annals of Oncology*. Published online 2013. doi:10.1093/annonc/mds601
38. Encarnação JC, Abrantes AM, Pires AS, Botelho MF. Revisit dietary fiber on colorectal cancer: butyrate and its role on prevention and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*. Published online 2015. doi:10.1007/s10555-015-9578-9
39. Gingras D, Béliveau R. Colorectal cancer prevention through dietary and lifestyle modifications. *Cancer Microenvironment*. Published online 2011. doi:10.1007/s12307-010-0060-5
40. Unlu A, Kirca O, Ozdogan M, Nayır E. High-dose vitamin C and cancer. *Journal of Oncological Science*. Published online 2016. doi:10.1016/j.jons.2015.11.010
41. Qin T, Du M, Du H, Shu Y, Wang M, Zhu L. Folic acid supplements and colorectal cancer risk: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Scientific Reports*. 2015;5. doi:10.1038/srep12044
42. Limsui D, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Weisenberger DJ, Laird PW, Lynch CF, Anderson KE, French AJ, Haile RW, Harnack LJ, Potter JD, Slager SL, Smyrk TC, Thibodeau SN, Cerhan JR, Limburg PJ. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(14):1012-1022. doi:10.1093/jnci/djq201
43. Chu KM, Cho CH, Shin VY. Nicotine and gastrointestinal disorders: its role in ulceration

- and cancer development. *Curr Pharm Des*. Published online 2013. doi:10.2174/1381612811306010005
44. Lodovici M, Bigagli E. Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Published online 2009. doi:10.3390/ijerph6030874
 45. Cross AJ, Boca S, Freedman ND, Caporaso NE, Huang WY, Sinha R, Sampson JN, Moore SC. Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. Published online 2014. doi:10.1093/carcin/bgu071
 46. Oyesanmi O, Snyder D, Sullivan N, Reston J, Treadwell J, Schoelles KM. *Alcohol Consumption and Cancer Risk: Understanding Possible Causal Mechanisms for Breast and Colorectal Cancers.*; 2010. doi:10.1046/j.1365-2699.2002.00766.x
 47. Bongaerts BWC, de Goeij AFPM, de Vogel S, van den Brandt PA, Goldbohm RA, Weijenberg MP. Alcohol consumption and distinct molecular pathways to colorectal cancer. *British Journal of Nutrition*. Published online 2007. doi:10.1017/S0007114507381336
 48. Church DN, Midgley RS, Kerr DJ. Colorectal cancer. In: *Biotargets of Cancer in Current Clinical Practice.* ; 2012. doi:10.1007/978-1-61779-615-9_9
 49. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington KM, Carneiro F, Cree IA. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. Published online 2019. doi:10.1111/his.13975
 50. Kanth P, Grimmett J, Champine M, Burt R, Samadder NJ. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *American Journal of Gastroenterology*. 2017;112(10):1509-1525. doi:10.1038/ajg.2017.212
 51. Kantor M, Sobrado J, Patel S, Eiseler S, Ochner C. Hereditary Colorectal Tumors: A Literature Review on MUTYH-Associated Polyposis. *Gastroenterology Research and Practice*. 2017;2017:8693182. doi:10.1155/2017/8693182
 52. Soyer T. Polypoid disease of colon in children. *Pediatric Surgery International*. Published online January 21, 2020. doi:10.1007/s00383-020-04621-3
 53. Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes A, Balmaña J, Martinelli E. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2019;30(10):1558-1571. doi:10.1093/annonc/mdz233
 54. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2017;109(8). doi:10.1093/jnci/djw332
 55. Karstensen JG, Burisch J, Pommergaard HC, Aalling L, Højen H, Jespersen N, Schmidt PN, Bülow S. Colorectal Cancer in Individuals With Familial Adenomatous Polyposis, Based on Analysis of the Danish Polyposis Registry. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2019;17(11):2294-2300.e1. doi:10.1016/j.cgh.2019.02.008
 56. Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, Leunen K, Macken L, Peeters M, Plomteux O, Polus M, Poppe B, Sempoux C, Tejpar S, Van Den Eynde M, Van Gossum A, Vannoote J, Kartheuser A, Van Cutsem E. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. *Acta gastro-enterologica Belgica*. 2011;74(3):415-420. Accessed February 19, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22103047>

57. Dinarvand P, Davaro EP, Doan J V., Ising ME, Evans NR, Phillips NJ, Lai J, Guzman MA. Familial adenomatous polyposis syndrome an update and review of extraintestinal manifestations. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2019;143(11):1382-1398. doi:10.5858/arpa.2018-0570-RA
58. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(5):335-346. doi:10.1038/nrm1907
59. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008;129(7-8):391-407. doi:10.1016/j.mad.2008.02.012
60. Nojadeh JN, Sharif SB, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI Journal*. 2018;17:159-168. doi:10.17179/excli2017-948
61. Ellegren H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. 2004;5(6):435-445. doi:10.1038/nrg1348
62. Bansidhar BJ. Extracolonic manifestations of lynch syndrome. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2012;25(2):103-110. doi:10.1055/s-0032-1313781
63. Velter C, Caussade P, Fricker JP, Cribier B. Syndrome de Muir-Torre et syndrome de Turcot. *Annales de Dermatologie et de Venereologie*. 2017;144(8-9):525-529. doi:10.1016/j.annder.2017.01.017
64. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(21):1631-1634. doi:10.1093/jnci/djh288
65. Carballal S, Rodríguez-Alcalde D, Moreira L, Hernández L, Rodríguez L, Rodríguez-Moranta F, Gonzalo V, Bujanda L, Bessa X, Poves C, Cubiella J, Castro I, González M, Moya E, Oquiñena S, Clofent J, Quintero E, Esteban P, Piñol V, Fernández FJ, Jover R, Cid L, López-Cerón M, Cuatrecasas M, López-Vicente J, Leoz ML, Rivero-Sánchez L, Castells A, Pellisé M, Balaguer F. Colorectal cancer risk factors in patients with serrated polyposis syndrome: A large multicentre study. *Gut*. 2016;65(11):1829-1837. doi:10.1136/gutjnl-2015-309647
66. Nejadtaghi M, Jafari H, Farrokhi E, Samani KG. Familial Colorectal Cancer Type X (FCCTX) and the correlation with various genes—A systematic review. *Current Problems in Cancer*. 2017;41(6):388-397. doi:10.1016/j.currproblcancer.2017.10.002
67. Aspeslagh S, Morel D, Soria J-C, Postel-Vinay S. Epigenetic modifiers as new immunomodulatory therapies in solid tumours. *Annals of Oncology*. 2018;29(4):812-824. doi:10.1093/annonc/mdy050
68. Drake TM, Søreide K. Cancer epigenetics in solid organ tumours: A primer for surgical oncologists. *European Journal of Surgical Oncology*. 2019;45(5):736-746. doi:10.1016/j.ejso.2019.02.005
69. Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *The Lancet*. 2018;392(10149):777-786. doi:10.1016/S0140-6736(18)31268-6
70. Simó-Riudalbas L, Esteller M. Cancer genomics identifies disrupted epigenetic genes. *Human Genetics*. 2014;133(6):713-725. doi:10.1007/s00439-013-1373-5
71. Berg M, Søreide K. Genetic and epigenetic traits as biomarkers in colorectal cancer.

- International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(12):9426-9439. doi:10.3390/ijms12129426
72. Mojarad EN, Kuppen PJK, Aghdaei HA, Zali MR. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2013;6(3):120-128. doi:10.22037/ghfbb.v6i3.383
 73. Suvà ML, Riggi N, Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*. 2013;340(6127):1567-1570. doi:10.1126/science.1230184
 74. Chatterjee A, Rodger EJ, Eccles MR. Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*. 2018;51:149-159. doi:10.1016/j.semcancer.2017.08.004
 75. Jeschke J, Bizet M, Desmedt C, Calonne E, Dedeurwaerder S, Garaud S, Koch A, Larsimont D, Salgado R, Eynden G Van den, Gallo KW, Bontempi G, Defrance M, Sotiriou C, Fuks F. DNA methylation–based immune response signature improves patient diagnosis in multiple cancers. *The Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(8):3090-3102. doi:10.1172/JCI91095
 76. H Salim OE, Hamid HKS, Mekki SO, Suleiman SH, Ibrahim SZ. Colorectal carcinoma associated with schistosomiasis: A possible causal relationship. *World Journal of Surgical Oncology*. Published online 2010. doi:10.1186/1477-7819-8-68
 77. Antonic V, Stojadinovic A, Kester KE, Weina PJ, Brücher BDMB, Protic M, Avital I, Izadjoo M. Significance of infectious agents in colorectal cancer development. *Journal of Cancer*. Published online 2013. doi:10.7150/jca.5835
 78. Gami B, Kubba F, Ziprin P. Human Papilloma Virus and Squamous Cell Carcinoma of the Anus. *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 2014;8:CMO.S13241. doi:10.4137/CMO.S13241
 79. Chen H, Chen XZ, Waterboer T, Castro FA, Brenner H. Viral infections and colorectal cancer: A systematic review of epidemiological studies. *International Journal of Cancer*. Published online 2015. doi:10.1002/ijc.29180
 80. Ruan W, Engevik MA, Spinler JK, Versalovic J. Healthy Human Gastrointestinal Microbiome: Composition and Function After a Decade of Exploration. *Digestive Diseases and Sciences*. Published online February 18, 2020. doi:10.1007/s10620-020-06118-4
 81. Pushpanathan P, Mathew G, Selvarajan S, Seshadri K, Srikanth P. Gut microbiota and its mysteries. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2019;37(2):268-277. doi:10.4103/ijmm.IJMM_19_373
 82. Ansari I, Raddatz G, Gutekunst J, Ridnik M, Cohen D, Abu-Remaileh M, Tuganbaev T, Shapiro H, Pikarsky E, Elinav E, Lyko F, Bergman Y. The microbiota programs DNA methylation to control intestinal homeostasis and inflammation. *Nature Microbiology*. Published online February 3, 2020:1-10. doi:10.1038/s41564-019-0659-3
 83. Dahmus JD, Kotler DL, Kastenberg DM, Kistler CA. The gut microbiome and colorectal cancer: A review of bacterial pathogenesis. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2018;9(4):769-777. doi:10.21037/jgo.2018.04.07
 84. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(6):954-964. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.004
 85. Yoon K, Kim N. The Effect of Microbiota on Colon Carcinogenesis. *Journal of Cancer*

- Prevention*. 2018;23(3):117-125. doi:10.15430/jcp.2018.23.3.117
86. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science (New York, NY)*. 2018;362(6416):776-780. doi:10.1126/science.aau5812
 87. Carmody RN, Gerber GK, Luevano JM, Gatti DM, Somes L, Svenson KL, Turnbaugh PJ. Diet Dominates Host Genotype in Shaping the Murine Gut Microbiota. *Cell Host & Microbe*. 2015;17(1):72-84. doi:10.1016/j.chom.2014.11.010
 88. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science*. 2011;334(6052):105-108. doi:10.1126/science.1208344
 89. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, Mor U, Dori-Bachash M, Bashardes S, Zur M, Regev-Lehavi D, Ben-Zeev Brik R, Federici S, Horn M, Cohen Y, Moor AE, Zeevi D, Korem T, Kotler E, Harmelin A, Itzkovitz S, Maharshak N, Shibolet O, Pevsner-Fischer M, Shapiro H, Sharon I, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell*. 2018;174(6):1406-1423.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.08.047
 90. Zaneveld JR, McMinds R, Vega Thurber R. Stress and stability: applying the Anna Karenina principle to animal microbiomes. *Nature Microbiology*. 2017;2(9):17121. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.121
 91. Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project: Dynamic Analysis of Microbiome-Host Omics Profiles during Periods of Human Health and Disease. *Cell Host & Microbe*. 2014;16(3):276-289. doi:10.1016/j.chom.2014.08.014
 92. Satgé D. A tumor profile in primary immune deficiencies challenges the cancer immune surveillance concept. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(MAY). doi:10.3389/fimmu.2018.01149
 93. Mortaz E, Tabarsi P, Mansouri D, Khosravi A, Garssen J, Velayati A, Adcock IM. Cancers related to immunodeficiencies: Update and perspectives. *Frontiers in Immunology*. 2016;7(SEP). doi:10.3389/fimmu.2016.00365
 94. O'Neill TJ, Nguemo JD, Tynan AM, Burchell AN, Antoniou T. Risk of Colorectal Cancer and Associated Mortality in HIV: A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. Vol 75. Lippincott Williams and Wilkins; 2017:439-447. doi:10.1097/QAI.0000000000001433
 95. Safaeian M, Robbins HA, Berndt SI, Lynch CF, Fraumeni JF, Engels EAEA, Engels EAEA. Risk of Colorectal Cancer after Solid Organ Transplantation in the United States. *American Journal of Transplantation*. 2016;16(3):960-967. doi:10.1111/ajt.13549
 96. Angriman I, Furian L, Scarpa M, Fassan M, Morgan S, Porzionato A, Kotsafti A, Saadeh L, Silvestre C, De Caro R, Carraro A, Tedeschi U, Bardini R, Rigotti P, Ruge M, Castoro C, Castagliuolo I, Scarpa M. Effects of immune suppression for transplantation on inflammatory colorectal cancer progression. *Oncogenesis*. 2018;7(6):1-9. doi:10.1038/s41389-018-0055-5
 97. Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, Rothenberger DA, Virnig BA. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: A population-based study. *Gastroenterology*. Published online 2005. doi:10.1053/j.gastro.2004.12.038

98. Gandomani HS, Yousefi SM, Aghajani M, Mohammadian-Hafshejani A, Tarazoj AA, Pouyesh V, Salehiniya H. Colorectal cancer in the world: incidence, mortality and risk factors. *Biomedical Research and Therapy*. Published online 2017. doi:10.15419/bmrat.v4i10.372
99. Azimuddin K, Khubchandani IT, Stasik JJ, Rosen L, Riether RD. Neoplasia after ureterosigmoidostomy. *Diseases of the Colon and Rectum*. Published online 1999. doi:10.1007/BF02236220
100. Khan MN, Naqvi AH, Lee RE. Carcinoma of sigmoid colon following urinary diversion: A case report and review of literature. *World Journal of Surgical Oncology*. Published online 2004. doi:10.1186/1477-7819-2-20
101. Gopalan S, Bose JC, Periasamy S. Anastomotic Recurrence of Colon Cancer—is it a Local Recurrence, a Second Primary, or a Metastatic Disease (Local Manifestation of Systemic Disease)? *Indian Journal of Surgery*. Published online 2015. doi:10.1007/s12262-014-1074-x
102. Arlen M, Crawford J, Coppa G, Saric O, Bandovic J, Doubakovski A, Sullivan J, Conte C, Kadison A, Procaccino J, Arlen P, Wang X, Molmenti E. The cause and prevention of anastomotic recurrence following colectomy: An immunohistochemical approach for detecting transforming colonocytes. *Journal of Cancer*. Published online 2014. doi:10.7150/jca.9485
103. Vakiani E, Shah RH, Berger MF, Makohon-Moore AP, Reiter JG, Ostrovnaya I, Attiyeh MA, Cercek A, Shia J, Iacobuzio-Donahue CA, Solit DB, Weiser MR. Local recurrences at the anastomotic area are clonally related to the primary tumor in sporadic colorectal carcinoma. *Oncotarget*. Published online 2017. doi:10.18632/oncotarget.17200
104. Foster PA. Oestrogen and colorectal cancer: Mechanisms and controversies. *International Journal of Colorectal Disease*. Published online 2013. doi:10.1007/s00384-012-1628-y
105. Barzi A, Lenz AM, Labonte MJ, Lenz HJ. Molecular pathways: Estrogen pathway in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. Published online 2013. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0325
106. Gordon MB, Nakhle S, Ludlam WH. Patients with Acromegaly Presenting with Colon Cancer: A Case Series. *Case Reports in Endocrinology*. Published online 2016. doi:10.1155/2016/5156295
107. Liu T-C, Stappenbeck TS. Genetics and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2016;11(1):127-148. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044152
108. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*. 2017;390(10114):2769-2778. doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0
109. Kim DH, Cheon JH. Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Network*. 2017;17(1):25-40. doi:10.4110/in.2017.17.1.25
110. Sugita A, Sachar DB, Bodian C, Ribeiro MB, Aufses AH, Greenstein AJ. Colorectal cancer in ulcerative colitis. Influence of anatomical extent and age at onset on colitis-cancer interval. *Gut*. 1991;32(2):167-169. doi:10.1136/gut.32.2.167

111. Freeman HJ. Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(12):1810-1811. doi:10.3748/wjg.14.1810
112. Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: The risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(29):9872-9881. doi:10.3748/wjg.v20.i29.9872
113. Winawer SJ. The History of Colorectal Cancer Screening: A Personal Perspective. *Digestive Diseases and Sciences*. Published online 2015. doi:10.1007/s10620-014-3466-y
114. Winawer SJ, Zauber a G, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *The New England journal of medicine*. Published online 1993. doi:10.1056/NEJM199312303292701
115. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Andrews KS, Brooks D, Bond J, Dash C, Giardiello FM, Glick S, Johnson D, Johnson CD, Levin TR, Pickhardt PJ, Rex DK, Smith RA, Thorson A, Winawer SJ. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*. Published online 2008. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.002
116. Von Karsa L, Patnick J, Segnan N, Atkin W, Halloran S, Lansdorp-Vogelaar I, Malila N, Minozzi S, Moss S, Quirke P, Steele RJ, Vieth M, Aabakken L, Altenhofen L, Ancelle-Park R, Antoljak N, Anttila A, Armaroli P, Arrossi S, Austoker J, Banzi R, Bellisario C, Blom J, Brenner H, Bretthauer M, Cancela MC, Costamagna G, Cuzick J, Dai M, Daniel J, Dekker E, Delicata N, Ducarroz S, Erfkamp H, Espinàs JA, Faivre J, Wood LF, Flugelman A, Frkovic-Grazio S, Geller B, Giordano L, Grazzini G, Green J, Hamashima C, Herrmann C, Hewitson P, Hoff G, Holten I, Jover R, Kaminski MF, Kuipers EJ, Kurtinaitis J, Lambert R, Launoy G, Lee W, Leicester R, Leja M, Lieberman D, Lignini T, Lucas E, Lynge E, Mádai S, Marinho J, Zakotnik JM, Minoli G, Monk C, Morais A, Muwonge R, Nadel M, Neamtui L, Tuser MP, Pignone M, Pox C, Primic-Zakelj M, Psaila J, Rabeneck L, Ransohoff D, Rasmussen M, Regula J, Ren J, Rennert G, Rey J, Riddell RH, Risio M, Rodrigues V, Saito H, Sauvaget C, Scharpantgen A, Schmiegell W, Senore C, Siddiqi M, Sighoko D, Smith R, Smith S, Suchanek S, Suonio E, Tong W, Törnberg S, et al. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis: Overview and introduction to the full Supplement publication. *Endoscopy*. Published online 2013. doi:10.1055/s-0032-1325997
117. Quirke P, Risio M, Lambert R, Von Karsa L, Vieth M. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis-European recommendations. *Virchows Archiv*. 2011;458(1):1-19. doi:10.1007/s00428-010-0977-6
118. Bnard F, Brkun AN, Martel M, Von Renteln D. Systematic review of colorectal cancer screening guidelines for average-risk adults: Summarizing the current global recommendations. *World Journal of Gastroenterology*. Published online 2018. doi:10.3748/wjg.v24.i1.124
119. Vieth M, Quirke P, Lambert R, Von Karsa L, Risio M. European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. First Edition Annotations of colorectal lesions. *Endoscopy*. Published online 2012. doi:10.1055/s-0032-1309798
120. Sung JY, Ng SC, Chan FKL, Chiu HM, Kim HS, Matsuda T, Ng SSM, Lau JYW, Zheng S, Adler S, Reddy N, Yeoh KG, Tsoi KKF, Ching JYL, Kuipers EJ, Rabeneck L, Young GP, Steele RJ, Lieberman D, Goh KL. An updated Asia Pacific Consensus Recommendations on colorectal

- cancer screening. *Gut*. Published online 2015. doi:10.1136/gutjnl-2013-306503
121. Segura PP, Fombella JPB, Lorenzo BP, Martín MR, Lopez PG. SEOM guide to primary and secondary prevention of cancer: 2014. *Clinical and Translational Oncology*. Published online 2014. doi:10.1007/s12094-014-1215-5
 122. Fang J-Y, Zheng S, Jiang B, Lai M-D, Fang D-C, Han Y, Sheng Q-J, Li J-N, Chen Y-X, Gao Q-Y. Consensus on the Prevention, Screening, Early Diagnosis and Treatment of Colorectal Tumors in China: Chinese Society of Gastroenterology, October 14-15, 2011, Shanghai, China. *Gastrointestinal Tumors*. Published online 2014. doi:10.1159/000362585
 123. Martín-López JE, Beltrán-Calvo C, Rodríguez-López R, Molina-López T. Comparison of the accuracy of CT colonography and colonoscopy in the diagnosis of colorectal cancer. *Colorectal Disease*. Published online 2014. doi:10.1111/codi.12506
 124. Pickhardt PJ. CT Colonography for Population Screening: Ready for Prime Time? *Digestive Diseases and Sciences*. Published online 2015. doi:10.1007/s10620-014-3454-2
 125. Zorzi M, Hassan C, Capodaglio G, Fedato C, Montaguti A, Turrin A, Rosano A, Monetti D, Stocco C, Baracco S, Russo F, Repici A, Rugge M. Long-term performance of colorectal cancerscreening programmes based on the faecal immunochemical test. *Gut*. 2018;67(12):2124-2130. doi:10.1136/gutjnl-2017-314753
 126. Ahlquist DA. Multi-Target Stool DNA Test: A New High Bar for Noninvasive Screening. *Digestive Diseases and Sciences*. Published online 2015. doi:10.1007/s10620-014-3451-5
 127. Pickhardt PJ. Emerging stool-based and blood-based non-invasive DNA tests for colorectal cancer screening: the importance of cancer prevention in addition to cancer detection. *Abdominal Radiology*. Published online 2016. doi:10.1007/s00261-016-0798-4
 128. Dhaliwal A, Vlachostergios PJ, Oikonomou KG, Moshenyat Y. Fecal DNA testing for colorectal cancer screening: Molecular targets and perspectives. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. Published online 2015. doi:10.4251/wjgo.v7.i10.178
 129. Hou N, Huo D, Dignam JJ. Prevention of colorectal cancer and dietary management. *Chinese Clinical Oncology*. 2013;2(2):13. doi:10.3978/j.issn.2304-3865.2013.04.03
 130. Cook NR, Lee IM, Zhang SM, Moorthy MV, Buring JE. Alternate-day, low-dose aspirin and cancer risk: Long-term observational follow-up of a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. Published online 2013. doi:10.7326/0003-4819-159-2-201307160-00002
 131. Zhou P, Cheng SW, Yang R, Wang B, Liu J. Combination chemoprevention: Future direction of colorectal cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention*. Published online 2012. doi:10.1097/CEJ.0b013e32834dbbfd
 132. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, García FAR, Gillman MW, Harper DM, Kemper AR, Krist AH, Kurth AE, Landefeld CS, Mangione CM, Owens DK, Phillips WR, Phipps MG, Pignone MP, Siu AL. Screening for colorectal cancer: US preventive services task force recommendation statement. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2016;315(23):2564-2575. doi:10.1001/jama.2016.5989
 133. Blanke CD. Celecoxib with chemotherapy in colorectal cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2002;16(4 Suppl 3):17-21. Accessed February 12, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014863>
 134. Labianca R, Nordlinger B, Beretta GD, Mosconi S, Mandala M, Cervantes A, Arnold D,

- ESMO Guidelines Working Group. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2013;24(suppl 6):vi64-vi72. doi:10.1093/annonc/mdt354
135. Pavlopoulou A, Scorilas A. A comprehensive phylogenetic and structural analysis of the carcinoembryonic antigen (CEA) gene family. *Genome Biology and Evolution*. Published online 2014. doi:10.1093/gbe/evu103
 136. Chau I, Allen MJ, Cunningham D, Norman AR, Brown G, Ford HER, Tebbutt N, Tait D, Hill M, Ross PJ, Oates J. The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Published online 2004. doi:10.1200/JCO.2004.05.041
 137. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, Arnold D, ESMO Guidelines Committee. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology*. 2017;28(suppl_4):iv22-iv40. doi:10.1093/annonc/mdx224
 138. Bipat S, Niekel MC, Comans EFI, Nio CY, Bemelman WA, Verhoef C, Stoker J. Imaging modalities for the staging of patients with colorectal cancer. *Netherlands Journal of Medicine*. Published online 2012.
 139. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic Imaging of Colorectal Liver Metastases with CT, MR Imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: A Meta-Analysis of Prospective Studies Including Patients Who Have Not Previously Undergone Treatment. *Radiology*. Published online 2010. doi:10.1148/radiol.10100729
 140. Henrikson NB, Webber EM, Goddard KA, Scrol A, Piper M, Williams MS, Zallen DT, Calonge N, Ganiats TG, Janssens ACJW, Zauber A, Lansdorp-Vogelaar I, Van Ballegooijen M, Whitlock EP. Family history and the natural history of colorectal cancer: Systematic review. *Genetics in Medicine*. Published online 2015. doi:10.1038/gim.2014.188
 141. Hagen CE, Farooq A. Histologic evaluation of malignant polyps and low-stage colorectal carcinoma. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2019;143(12):1450-1454. doi:10.5858/arpa.2019-0291-RA
 142. Yuan H, Dong Q, Zheng B, Hu X, Xu JB, Tu S. Lymphovascular invasion is a high risk factor for stage I/II colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(28):46565-46579. doi:10.18632/oncotarget.15425
 143. Alotaibi AM, Lee JL, Kim J, Lim SB, Yu CS, Kim TW, Kim JH, Kim JC. Prognostic and Oncologic Significance of Perineural Invasion in Sporadic Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2017;24(6):1626-1634. doi:10.1245/s10434-016-5748-4
 144. Cienfuegos JA, Martínez P, Baixauli J, Beorlegui C, Rosenstone S, Sola JJ, Rodríguez J, Hernández-Lizoáin JL. Perineural Invasion is a Major Prognostic and Predictive Factor of Response to Adjuvant Chemotherapy in Stage I–II Colon Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2017;24(4):1077-1084. doi:10.1245/s10434-016-5561-0
 145. Knijn N, Mogk SC, Teerenstra S, Simmer F, Nagtegaal ID. Perineural invasion is a strong prognostic factor in colorectal cancer. *American Journal of Surgical Pathology*. 2016;40(1):103-112. doi:10.1097/PAS.0000000000000518
 146. Kikuchi R, Takano M, Takagi K, Fujimoto N, Nozaki R, Fujiyoshi T, Uchida Y. Management of early invasive colorectal cancer - Risk of recurrence and clinical guidelines. *Diseases of*

- the Colon & Rectum*. 1995;38(12):1286-1295. doi:10.1007/BF02049154
147. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE, Wruble LD. Prognostic factors in colorectal carcinomas arising in adenomas: Implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. *Gastroenterology*. 1985;89(2):328-336. doi:10.1016/0016-5085(85)90333-6
 148. Tomita S, Ichikawa K, Fujimori T. Desmoplastic Reaction in Biopsy Specimens of T1 Stage Colorectal Cancer Plays a Critical Role in Defining the Level of Sub-Mucosal Invasion. In: *Colonoscopy and Colorectal Cancer Screening - Future Directions*. ; 2013. doi:10.5772/53451
 149. Grizzi F, Celesti G, Basso G, Laghi L. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hype or hope? *World Journal of Gastroenterology*. 2012;18(45):6532-6536. doi:10.3748/wjg.v18.i45.6532
 150. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Modern Pathology*. 2012;25(10):1315-1325. doi:10.1038/modpathol.2012.94
 151. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: A promising parameter in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2012;106(11):1713-1717. doi:10.1038/bjc.2012.127
 152. Trinh A, Ladrach C, Dawson HE, ten Hoorn S, Kuppen PJK, Reimers MS, Koopman M, Punt CJA, Lugli A, Vermeulen L, Zlobec I. Tumour budding is associated with the mesenchymal colon cancer subtype and RAS/RAF mutations: a study of 1320 colorectal cancers with Consensus Molecular Subgroup (CMS) data. *British Journal of Cancer*. 2018;119(10):1244-1251. doi:10.1038/s41416-018-0230-7
 153. Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Frontiers in Medicine*. 2015;2(MAR):11. doi:10.3389/fmed.2015.00011
 154. Cho S-J, Kakar S. Tumor Budding in Colorectal Carcinoma Translating a Morphologic Score Into Clinically Meaningful Results. doi:10.5858/arpa.2018-0082-RA
 155. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, El Zimaity H, Fléjou JF, Hansen TP, Hartmann A, Kakar S, Langner C, Nagtegaal I, Puppa G, Riddell R, Ristimäki A, Sheahan K, Smyrk T, Sugihara K, Terris B, Ueno H, Vieth M, Zlobec I, Quirke P. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern Pathology*. 2017;30(9):1299-1311. doi:10.1038/modpathol.2017.46
 156. Barresi V, Reggiani Bonetti L, Ieni A, Caruso RA, Tuccari G. Poorly Differentiated Clusters: Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2017;16(1):9-15. doi:10.1016/j.clcc.2016.06.002
 157. Hong M, Kim JW, Shin MK, Kim BC. Poorly differentiated clusters in colorectal adenocarcinomas share biological similarities with micropapillary patterns as well as tumor buds. *Journal of Korean Medical Science*. 2017;32(10):1595-1602. doi:10.3346/jkms.2017.32.10.1595
 158. Reggiani Bonetti L, Barresi V, Bettelli S, Domati F, Palmiere C. Poorly differentiated clusters (PDC) in colorectal cancer: What is and ought to be known. *Diagnostic Pathology*. 2016;11(1). doi:10.1186/s13000-016-0481-7
 159. Yang M, Rehman AU, Zuo C, Sheehan CE, Lee EC, Lin J, Zhao Z, Choi E, Lee H. A novel histologic grading scheme based on poorly differentiated clusters is applicable to treated

- rectal cancer and is associated with established histopathological prognosticators. *Cancer Medicine*. 2016;5(7):1510-1518. doi:10.1002/cam4.740
160. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2014;25(suppl 3):iii1-iii9. doi:10.1093/annonc/mdu260
 161. Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, Werner J, Angele M. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *Journal of Oncology*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/7407190
 162. Munker S, Gerken M, Fest P, Ott C, Schnoy E, Fichtner-Feigl S, Wiggermann P, Vogelhuber M, Herr W, Stroszczyński C, Schlitt HJ, Evert M, Reng M, Klinkhammer-Schalke M, Teufel A. Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects. *BMC Cancer*. 2018;18(1):455. doi:10.1186/s12885-018-4380-z
 163. Gao P, Huang X, Song Y, Sun J, Chen X, Sun Y, Jiang Y, Wang Z. Impact of timing of adjuvant chemotherapy on survival in stage III colon cancer: a population-based study. *BMC Cancer*. 2018;18(1):234. doi:10.1186/s12885-018-4138-7
 164. Obias VJ, Reynolds HL. Multidisciplinary teams in the management of rectal cancer. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*. 2007;20(3):143-147. doi:10.1055/s-2007-984858
 165. Martins J, Alexandrino H, Oliveira R, Cipriano MAA, Falcão D, Ferreira L, Martins R, Serôdio M, Martins M, Tralhão JGG, Pradão Castro L, Castro Sousa F, Prado e Castro L, Castro e Sousa F. Sinusoidal dilation increases the risk of complications in hepatectomy for CRCLM - Protective effect of bevacizumab and diabetes mellitus, serum gamma-glutamyltranspeptidase as predictive factor. *European Journal of Surgical Oncology*. 2016;42(5):713-721. doi:10.1016/j.ejso.2016.02.017
 166. Morris-Stiff G, Tan YM, Vauthey JN. Hepatic complications following preoperative chemotherapy with oxaliplatin or irinotecan for hepatic colorectal metastases. *European Journal of Surgical Oncology*. 2008;34(6):609-614. doi:10.1016/j.ejso.2007.07.007
 167. Remo A, Fassan M, Vanoli A, Bonetti LR, Barresi V, Tatangelo F, Gafà R, Giordano G, Pancione M, Grillo F, Mastracci L. Morphology and molecular features of rare colorectal carcinoma histotypes. *Cancers*. 2019;11(7). doi:10.3390/cancers11071036
 168. Wu X, Lin H, Li S. Prognoses of different pathological subtypes of colorectal cancer at different stages: A population-based retrospective cohort study. *BMC Gastroenterology*. 2019;19(1):164. doi:10.1186/s12876-019-1083-0
 169. Li C, Zheng H, Jia H, Huang D, Gu W, Cai S, Zhu J. Prognosis of three histological subtypes of colorectal adenocarcinoma: A retrospective analysis of 8005 Chinese patients. *Cancer Medicine*. 2019;8(7):3411-3419. doi:10.1002/cam4.2234
 170. Hirano D, Oka S, Tanaka S, Sumimoto K, Ninomiya Y, Tamaru Y, Shigita K, Hayashi N, Urabe Y, Kitadai Y, Shimamoto F, Arihiro K, Chayama K. Clinicopathologic and endoscopic features of early-stage colorectal serrated adenocarcinoma. *BMC Gastroenterology*. 2017;17(1):158. doi:10.1186/s12876-017-0702-x
 171. Friedman K, Brodsky AS, Lu S, Wood S, Gill AJ, Lombardo K, Yang D, Resnick MB. Medullary carcinoma of the colon: A distinct morphology reveals a distinctive

- immunoregulatory microenvironment. *Modern Pathology*. 2016;29(5):528-541. doi:10.1038/modpathol.2016.54
172. Gómez-Álvarez MA, Lino-Silva LS, Salcedo-Hernández RA, Padilla-Rosciano A, Ruiz-García EB, López-Basave HN, Calderillo-Ruiz G, Aguilar-Romero JM, Domínguez-Rodríguez JA, Herrera-Gómez Á, Meneses-García A. Medullary colonic carcinoma with microsatellite instability has lower survival compared with conventional colonic adenocarcinoma with microsatellite instability. *Przeegląd Gastroenterologiczny*. 2017;12(3):208-214. doi:10.5114/pg.2016.64740
 173. Gonzalez RS, Huh WJ, Cates JMM, Washington K, Beauchamp RD, Coffey RJ, Shi C. Micropapillary colorectal carcinoma: clinical, pathological and molecular properties, including evidence of epithelial–mesenchymal transition. *Histopathology*. 2017;70(2):223-231. doi:10.1111/his.13068
 174. Choi YY, Jeon YM, Kim YJ. Sarcomatoid carcinoma of colon: Extremely poor prognosis. *Journal of the Korean Surgical Society*. 2011;80(SUPPL. 1):S26. doi:10.4174/jkss.2011.80.Suppl1.S26
 175. Ong MLH, Schofield JB. Assessment of lymph node involvement in colorectal cancer. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2016;8(3):179. doi:10.4240/wjgs.v8.i3.179
 176. Kim HJ, Choi GS. Clinical implications of lymph node metastasis in colorectal cancer: Current status and future perspectives. *Annals of Coloproctology*. Published online 2019. doi:10.3393/ac.2017.09.04
 177. Zhang C-H, Li Y-Y, Zhang Q-W, Biondi A, Fico V, Persiani R, Ni X-C, Luo M. The Prognostic Impact of the Metastatic Lymph Nodes Ratio in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(DEC):628. doi:10.3389/fonc.2018.00628
 178. Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 1986;39(6):585-589. doi:10.1136/jcp.39.6.585
 179. Roxburgh CSD, McMillan DC. The role of the in situ local inflammatory response in predicting recurrence and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(5):451-466. doi:10.1016/j.ctrv.2011.09.001
 180. Roxburgh CSD, Salmond JM, Horgan PG, Oien KA, McMillan DC. Tumour inflammatory infiltrate predicts survival following curative resection for node-negative colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 2009;45(12):2138-2145. doi:10.1016/j.ejca.2009.04.011
 181. Richards CH, Flegg KM, Roxburgh CSD, Going JJ, Mohammed Z, Horgan PG, McMillan DC. The relationships between cellular components of the peritumoural inflammatory response, clinicopathological characteristics and survival in patients with primary operable colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2012;106(12):2010-2015. doi:10.1038/bjc.2012.211
 182. Väyrynen JP, Vornanen JO, Sajanti S, Böhm JP, Tuomisto A, Mäkinen MJ. An improved image analysis method for cell counting lends credibility to the prognostic significance of T cells in colorectal cancer. *Virchows Archiv*. 2012;460(5):455-465. doi:10.1007/s00428-012-1232-0
 183. Prizment AE, Vierkant RA, Smyrk TC, Tillmans LS, Lee JJ, Sriramarao P, Nelson HH, Lynch CF, Thibodeau SN, Church TR, Cerhan JR, Anderson KE, Limburg PJ. Tumor eosinophil infiltration and improved survival of colorectal cancer patients: Iowa Women's Health

- Study. *Modern Pathology*. 2016;29(5):516-527. doi:10.1038/modpathol.2016.42
184. Prizment AE, Anderson KE, Visvanathan K, Folsom AR. Inverse association of eosinophil count with colorectal cancer incidence: Atherosclerosis Risk in Communities study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2011;20(9):1861-1864. doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0360
 185. Strasser K, Walterskirchen N, Sacht M, Birnleitner H, Beer A, Pils D, Gerner MC, Schmetterer KG, Bachleitner-Hofmann T, Stift A, Bergmann M, Oehler R. Differences in macrophage colonization of the colorectal cancer and normal mucosa. *European Journal of Cancer*. 2019;110:S8. doi:10.1016/j.ejca.2019.01.040
 186. Yahaya MAF, Lila MAM, Ismail S, Zainol M, Afizan NARNM. Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducate Them. *Journal of Immunology Research*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/2368249
 187. Zhong X, Chen B, Yang Z. The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;45(1):356-365. doi:10.1159/000486816
 188. Szyłberg Ł, Karbownik D, Marszałek A. The Role of FOXP3 in Human Cancers. *Anticancer research*. 2016;36(8):3789-3794. Accessed February 18, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466478>
 189. Sun X, Feng Z, Wang Y, Qu Y, Gai Y. Expression of Foxp3 and its prognostic significance in colorectal cancer. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2017;30(2):201-206. doi:10.1177/0394632017710415
 190. Legitimo A, Consolini R, Failli A, Orsini G, Spisni R. Dendritic cell defects in the colorectal cancer. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2014;10(11):3224-3235. doi:10.4161/hv.29857
 191. Klintrup K, Mäkinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, Tuppurainen K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*. 2005;41(17):2645-2654. doi:10.1016/j.ejca.2005.07.017
 192. Kajihara M, Takakura K, Kanai T, Ito Z, Saito K, Takami S, Shimodaira S, Okamoto M, Ohkusa T, Koido S. Dendritic cell-based cancer immunotherapy for colorectal Cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(17):4275-4286. doi:10.3748/wjg.v22.i17.4275
 193. A. Chistiakov D, N. Orekhov A, V. Bobryshev Y. Dendritic Cells in Colorectal Cancer and a Potential for their Use in Therapeutic Approaches. *Current Pharmaceutical Design*. 2016;22(16):2431-2438. doi:10.2174/1381612822666160203141740
 194. Ganesh K, Stadler ZK, Cercek A, Mendelsohn RB, Shia J, Segal NH, Diaz LA. Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2019;16(6):361-375. doi:10.1038/s41575-019-0126-x
 195. Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2018;6(1):157. doi:10.1186/s40425-018-0479-7
 196. Bonaventura P, Shekarian T, Alcazer V, Valladeau-Guilemond J, Valsesia-Wittmann S, Amigorena S, Caux C, Depil S. Cold tumors: A therapeutic challenge for immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(FEB). doi:10.3389/fimmu.2019.00168

197. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, Grody W, Cushman-Vokoun AM, Funkhouser WK, Kopetz SE, Lieu C, Lindor NM, Minsky BD, Monzon FA, Sargent DJ, Singh VM, Willis J, Clark J, Colasacco C, Rumble RB, Temple-Smolkin R, Ventura CB, Nowak JA. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: Guideline from The American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(13):1453-1496. doi:10.1200/JCO.2016.71.9807
198. Yamashita S, Chun YS, Kopetz SE, Vauthey JN. Biomarkers in colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery*. 2018;105(6):618-627. doi:10.1002/bjs.10834
199. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Annals of Oncology*. Published online 2015. doi:10.1093/annonc/mdu378
200. Ursem C, Atreya CE, Van Loon K. Emerging treatment options for BRAF-mutant colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*. 2018;Volume 8:13-23. doi:10.2147/gicct.s125940
201. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, Agarwal A, Maru DM, Sieber O, Desai J. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623-4632. doi:10.1002/cncr.26086
202. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, Sylvester BE, Kemeny NE, Hechtman JF, Ladanyi M, Rosen N, Weiser MR, Capanu M, Solit DB, D'Angelica MI, Vakiani E, Saltz LB. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2014;120(15):2316-2324. doi:10.1002/cncr.28729
203. Loupakis F, Moretto R, Aprile G, Muntoni M, Cremolini C, Iacono D, Casagrande M, Ferrari L, Salvatore L, Schirripa M, Rossini D, De Maglio G, Fasola G, Calvetti L, Pilotto S, Carbognin L, Fontanini G, Tortora G, Falcone A, Sperduti I, Bria E. Clinico-pathological nomogram for predicting BRAF mutational status of metastatic colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2016;114(1):30-36. doi:10.1038/bjc.2015.399
204. Wang J, Shen J, Huang C, Cao M, Shen L. Clinicopathological significance of BRAFV600E mutation in colorectal cancer: An updated meta-analysis. *Journal of Cancer*. 2019;10(10):2332-2341. doi:10.7150/jca.30789
205. Kwon JH, Jeong BK, Yoon YS, Yu CS, Kim J. Utility of BRAF VE1 immunohistochemistry as a screening tool for colorectal cancer harboring BRAF V600E mutation. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. 2018;52(3):157-163. doi:10.4132/jptm.2018.03.28
206. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, Coffee EM, Nishino M, Cogdill AP, Brown RD, Pelle P Della, Dias-Santagata D, Hung KE, Flaherty KT, Piris A, Wargo JA, Settleman J, Mino-Kenudson M, Engelman JA. EGFR-mediated reactivation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF-mutant colorectal cancers to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discovery*. 2012;2(3):227-235. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0341
207. Ducreux M, Chamseddine A, Laurent-Puig P, Smolenschi C, Hollebecque A, Dartigues P, Samallin E, Boige V, Malka D, Gelli M. Molecular targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2019;11:1758835919856494. doi:10.1177/1758835919856494

208. Yaeger R, Kotani D, Mondaca S, Parikh AR, Bando H, Van Seventer EE, Taniguchi H, Zhao HY, Thant CN, De Stanchina E, Rosen N, Corcoran RB, Yoshino T, Yao Z, Ebi H. Response to anti-EGFR therapy in patients with BRAF non-V600-mutant metastatic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(23):7089-7097. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-2004
209. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, Kasi PM, Voss JS, Leal AD, Sun J, Ross J, Ali SM, Hubbard JM, Kipp BR, McWilliams RR, Kopetz S, Wolff RA, Grothey A. Non-V600BRAF mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer. In: *Journal of Clinical Oncology*. Vol 35. American Society of Clinical Oncology; 2017:2624-2630. doi:10.1200/JCO.2016.71.4394
210. Kang S, Na Y, Joung SY, Lee S II, Oh SC, Min BW. The significance of microsatellite instability in colorectal cancer after controlling for clinicopathological factors. *Medicine (United States)*. 2018;97(9). doi:10.1097/MD.00000000000010019
211. Srdjan M, Jadranka A, Ivan D, Branimir Z, Daniela B, Petar S, Velimir M, Zoran K. Microsatellite instability & survival in patients with stage II/III colorectal carcinoma. *Indian Journal of Medical Research, Supplement*. 2016;143(Suppl 1):104-111. doi:10.4103/0971-5916.191801
212. Zeinalian M, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Salehi R, Emami M. Clinical Aspects of Microsatellite Instability Testing in Colorectal Cancer. *Advanced Biomedical Research*. 2018;7(1):28. doi:10.4103/abr.abr_185_16
213. de Vries NL, Swets M, Vahrmeijer AL, Hokland M, Kuppen PJK. The immunogenicity of colorectal cancer in relation to tumor development and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(7). doi:10.3390/ijms17071030
214. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, Desai J, Hill A, Axelson M, Moss RA, Goldberg M V., Cao ZA, Ledezine JM, Maglinte GA, Kopetz S, André T. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2017;18(9):1182-1191. doi:10.1016/S1470-2045(17)30422-9
215. Serebriiskii IG, Connelly C, Frampton G, Newberg J, Cooke M, Miller V, Ali S, Ross JS, Handorf E, Arora S, Lieu C, Golemis EA, Meyer JE. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nature Communications*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11530-0
216. Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz HI, McCall SJ, Penault-Llorca F, Srock S, Bardelli A, Trusolino L. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2018;29(5):1108-1119. doi:10.1093/annonc/mdy100
217. Richman SD, Southward K, Chambers P, Cross D, Barrett J, Hemmings G, Taylor M, Wood H, Hutchins G, Foster JM, Oumie A, Spink KG, Brown SR, Jones M, Kerr D, Handley K, Gray R, Seymour M, Quirke P. HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: Analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *Journal of Pathology*. Published online 2016. doi:10.1002/path.4679
218. Valtorta E, Martino C, Sartore-Bianchi A, Penault-Llorca F, Viale G, Risio M, Rugge M, Grigioni W, Bencardino K, Lonardi S, Zagonel V, Leone F, Noe J, Ciardiello F, Pinto C, Labianca R, Mosconi S, Graiff C, Aprile G, Frau B, Garufi C, Loupakis F, Racca P, Tonini G,

- Lauricella C, Veronese S, Truini M, Siena S, Marsoni S, Gambacorta M. Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: Results from a validation study. *Modern Pathology*. Published online 2015. doi:10.1038/modpathol.2015.98
219. Meric-Bernstam F, Hurwitz H, Raghav KPS, McWilliams RR, Fakih M, VanderWalde A, Swanton C, Kurzrock R, Burris H, Sweeney C, Bose R, Spigel DR, Beattie MS, Blotner S, Stone A, Schulze K, Cuchelkar V, Hainsworth J. Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *The Lancet Oncology*. 2019;20(4):518-530. doi:10.1016/S1470-2045(18)30904-5
220. Greally M, Kelly CM, Cercek A. HER2: An emerging target in colorectal cancer. *Current Problems in Cancer*. 2018;42(6):560-571. doi:10.1016/j.currprobcancer.2018.07.001
221. Azevedo MA, Souza BD, Mader AMAA, Martins LC, Waisberg J. Immunohistochemical expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal carcinoma: Relation with clinicopathological parameters. *Journal of Coloproctology*. 2011;31(3):225-232. doi:10.1590/s2237-93632011000300001
222. Hutchinson RA, Adams RA, McArt DG, Salto-Tellez M, Jasani B, Hamilton PW. Epidermal growth factor receptor immunohistochemistry: new opportunities in metastatic colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine*. 2015;13(1):217. doi:10.1186/s12967-015-0531-z
223. Vacante M, Borzì AM, Basile F, Biondi A. Biomarkers in colorectal cancer: Current clinical utility and future perspectives. *World Journal of Clinical Cases*. 2018;6(15):869-881. doi:10.12998/wjcc.v6.i15.869
224. Okamura R, Boichard A, Kato S, Sicklick JK, Bazhenova L, Kurzrock R. Analysis of NTRK Alterations in Pan-Cancer Adult and Pediatric Malignancies: Implications for NTRK-Targeted Therapeutics. *JCO Precision Oncology*. 2018;(2):1-20. doi:10.1200/po.18.00183
225. Ricciuti B, Genova C, Crinò L, Libra M, Leonardi GC. Antitumor activity of larotrectinib in tumors harboring NTRK gene fusions: a short review on the current evidence. *OncoTargets and Therapy*. 2019;Volume 12:3171-3179. doi:10.2147/ott.s177051
226. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Dietel M, Hechtman JF, Troiani T, López-Rios F, Douillard JY, André F, Reis-Filho JS. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Annals of Oncology*. 2019;30(9):1417-1427. doi:10.1093/annonc/mdz204
227. Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, Aisner DL. Detection of Tumor NTRK Gene Fusions to Identify Patients Who May Benefit from Tyrosine Kinase (TRK) Inhibitor Therapy. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2019;21(4):553-571. doi:10.1016/j.jmoldx.2019.03.008
228. Lasota J, Chłopek M, Lamoureaux J, Christiansen J, Kowalik A, Wasąg B, Felisiak-Gołąbek A, Agaimy A, Biernat W, Canzonieri V, Centonze G, Chmielik E, Daum O, Dubová M, Dziuba I, Goertz S, Gózdź S, Guttmejer-Nasierowska A, Haglund C, Hałoń A, Hartmann A, Inaguma S, Iżycka-Świeszewska E, Kaczorowski M, Kita P, Kołos M, Kopczyński J, Michal M, Milione M, Okoń K, Pęksa R, Pyzlak M, Ristimäki A, Ryś J, Szostak B, Szpor J, Szumiło J, Teresiński L, Waloszczyk P, Wejman J, Wesołowski W, Miettinen M. Colonic Adenocarcinomas Harboring NTRK Fusion Genes: A Clinicopathologic and Molecular Genetic Study of 16 Cases and Review of the Literature. *American Journal of Surgical Pathology*. 2020;44(2):162-173. doi:10.1097/PAS.0000000000001377

229. Alves Martins BA, de Bulhões GF, Cavalcanti IN, Martins MM, de Oliveira PG, Martins AMA. Biomarkers in Colorectal Cancer: The Role of Translational Proteomics Research. *Frontiers in Oncology*. 2019;9:1284. doi:10.3389/fonc.2019.01284
230. Diaz LA, Marabelle A, Delord J-P, Shapira-Frommer R, Geva R, Peled N, Kim TW, Andre T, Van Cutsem E, Guimbaud R, Jaeger D, Elez E, Yoshino T, Joe AK, Lam B, Gause CK, Pruitt SK, Kang SP, Le DT. Pembrolizumab therapy for microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer (CRC) and non-CRC. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(15_suppl):3071-3071. doi:10.1200/jco.2017.35.15_suppl.3071
231. Valentini AM, Di Pinto F, Cariola F, Guerra V, Giannelli G, Caruso ML, Pirrelli M. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget*. 2018;9(9):8584-8596. doi:10.18632/oncotarget.24196
232. Li Y, He M, Zhou Y, Yang C, Wei S, Bian X, Christopher O, Xie L. The prognostic and clinicopathological roles of PD-L1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10(FEB). doi:10.3389/fphar.2019.00139
233. Passardi A, Canale M, Valgiusti M, Ulivi P. Immune checkpoints as a target for colorectal cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(6). doi:10.3390/ijms18061324
234. Oliveira AF, Bretes L, Furtado I. Review of PD-1/PD-L1 inhibitors in metastatic DMMR/MSI-H colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*. 2019;9(MAY). doi:10.3389/fonc.2019.00396
235. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, Blosser RL, Fan H, Wang H, Lubber BS, Zhang M, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Sears CL, Anders RA, Pardoll DM, Housseau F. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discovery*. 2015;5(1):43-51. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0863
236. Battaglin F, Naseem M, Lenz HJ, Salem ME. Microsatellite instability in colorectal cancer: Overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. 2018;16(11):735-747.
237. Romero D. TMB is linked with prognosis. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2019;16(6):336. doi:10.1038/s41571-019-0206-4
238. Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J, Sokol E, Jin D, Ross JS, Miller VA, Lim D, Amanam I, Chao J, Catenacci D, Cho M, Braitheh F, Klempner SJ, Ali SM, Fakih M. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2019;30(7):1096-1103. doi:10.1093/annonc/mdz134
239. Jacobson RA, Munding E, Hayden DM, Levy M, Kuzel TM, Pappas SG, Masood A. Evolving clinical utility of liquid biopsy in gastrointestinal cancers. *Cancers*. 2019;11(8). doi:10.3390/cancers11081164
240. Baraniskin A, Van Laethem JL, Wyrwicz L, Guller U, Wasan HS, Matysiak-Budnik T, Gruenberger T, Ducreux M, Carneiro F, Van Cutsem E, Seufferlein T, Schmiegel W. Clinical relevance of molecular diagnostics in gastrointestinal (GI) cancer: European Society of Digestive Oncology (ESDO) expert discussion and recommendations from the 17th European Society for Medical Oncology (ESMO)/World Congress on Gastrointestinal . In: *European Journal of Cancer*. Vol 86. Elsevier Ltd; 2017:305-317.

- doi:10.1016/j.ejca.2017.09.021
241. Norcic G. Liquid biopsy in colorectal cancer-current status and potential clinical applications. *Micromachines*. 2018;9(6). doi:10.3390/mi9060300
 242. Yamada T, Matsuda A, Koizumi M, Shinji S, Takahashi G, Iwai T, Takeda K, Ueda K, Yokoyama Y, Hara K, Hotta M, Matsumoto S, Yoshida H. Liquid Biopsy for the Management of Patients with Colorectal Cancer. *Digestion*. 2019;99(1):39-45. doi:10.1159/000494411
 243. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer biology & medicine*. 2016;13(1):120-135. doi:10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103
 244. Blank A, Roberts DE, Dawson H, Zlobec I, Lugli A. Tumor heterogeneity in primary colorectal cancer and corresponding metastases. Does the apple fall far from the tree? *Frontiers in Medicine*. 2018;5(AUG). doi:10.3389/fmed.2018.00234
 245. Sagaert X, Vanstapel A, Verbeek S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology*. 2018;85(1-2):72-84. doi:10.1159/000486721
 246. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, De Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa .E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernardis R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*. Published online 2015. doi:10.1038/nm.3967
 247. Centeno BA. Pathology of Liver Metastases. *Cancer Control*. 2006;13(1):13-26. doi:10.1177/107327480601300103
 248. Kawada K, Hasegawa S, Murakami T, Itatani Y, Hosogi H, Sonoshita M, Kitamura T, Fujishita T, Iwamoto M, Matsumoto T, Matsusue R, Hida K, Akiyama G, Okoshi K, Yamada M, Kawamura J, Taketo MM, Sakai Y. Molecular mechanisms of liver metastasis. *International Journal of Clinical Oncology*. 2011;16(5):464-472. doi:10.1007/s10147-011-0307-2
 249. Jones RP, Kokudo N, Folprecht G, Mise Y, Unno M, Malik HZ, Fenwick SW, Poston GJ. Colorectal Liver Metastases: A Critical Review of State of the Art. *Liver Cancer*. 2017;6(1):66-71. doi:10.1159/000449348
 250. Torzilli G, Adam R, Viganò L, Imai K, Goransky J, Fontana A, Toso C, Majno P, de Santibañes E, Santibañes E de, de Santibañes E. Surgery of Colorectal Liver Metastases: Pushing the Limits. *Liver Cancer*. 2017;6(1):80-89. doi:10.1159/000449495
 251. Hagness M, Foss A, Line P-D, Scholz T, Jørgensen PF, Fosby B, Boberg KM, Mathisen Ø, Gladhaug IP, Egge TS, Solberg S, Hausken J, Dueland S. Liver Transplantation for Nonresectable Liver Metastases From Colorectal Cancer. *Annals of Surgery*. 2013;257(5):800-806. doi:10.1097/SLA.0b013e3182823957
 252. Jones RP, Jackson R, Dunne DFJJ, Malik HZ, Fenwick SW, Poston GJ, Ghaneh P. *Systematic Review and Meta-Analysis of Follow-up after Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases*. Vol 99.; 2012:477-486. doi:10.1002/bjs.8667
 253. Jang KU, Kim CW, Kim K-HH, Lim S-BB, Yu CS, Kim TW, Kim PN, Kim JHJC, Kim JHJC. Prognostic factors in terms of the number of metastatic nodules in patients with colorectal cancer liver metastases. *Annals of Coloproctology*. 2016;32(3):92-100.

- doi:10.3393/ac.2016.32.3.92
254. Mise Y, Aloia TA, Brudvik KW, Schwarz L, Vauthey J-NN, Conrad C. Parenchymal-sparing hepatectomy in colorectal liver metastasis improves salvageability and survival. *Annals of Surgery*. 2016;263(1):146-152. doi:10.1097/SLA.0000000000001194
 255. Vermeulen PB, Colpaert C, Salgado R, Royers R, Hellemans H, Van den Heuvel E, Goovaerts G, Dirix LY, Van Marck E. Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia. *Journal of Pathology*. 2001;195(3):336-342. doi:10.1002/path.966
 256. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C, Roth A, Andres A, Audard V, Sartoretti P, Dousset B, Majno P, Soubrane O, Chaussade S, Mentha G, Terris B. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by liver surgery. *Annals of Oncology*. 2006;18(2):299-304. doi:10.1093/annonc/mdl386
 257. Fonseca GM, Herman P, Faraj SF, Kruger JAP, Coelho FF, Jeismann VB, Cecconello I, Alves VAF, Pawlik TM, de Mello ES. Pathological factors and prognosis of resected liver metastases of colorectal carcinoma: implications and proposal for a pathological reporting protocol. *Histopathology*. 2018;72(3):377-390. doi:10.1111/his.13378
 258. Eefsen RL, Van den Eynden GG, Høyer-Hansen G, Brodt P, Laerum OD, Vermeulen PB, Christensen IJ, Wettergren A, Federspiel B, Willemoe GL, Vainer B, Osterlind K, Illemann M. Histopathological growth pattern, proteolysis and angiogenesis in chemo-naïve patients resected for multiple colorectal liver metastases. *Journal of oncology*. 2012;2012:907971. doi:10.1155/2012/907971
 259. Eefsen RL, Engelholm L, Alpizar-Alpizar W, Van den Eynden GGEE, Vermeulen PB, Christensen IJ, Laerum OD, Rolff HC, Høyer-Hansen G, Vainer B, Osterlind K, Illemann M. Inflammation and uPAR-Expression in Colorectal Liver Metastases in Relation to Growth Pattern and Neo-adjuvant Therapy. *Cancer Microenvironment*. 2015;8(2):93-100. doi:10.1007/s12307-015-0172-z
 260. Nielsen K, Rolff HC, Eefsen RL, Vainer B. The morphological growth patterns of colorectal liver metastases are prognostic for overall survival. *Modern Pathology*. 2014;27(12):1641-1648. doi:10.1038/modpathol.2014.4
 261. Van den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Hoyer-Hansen G, Eefsen RL, Reynolds AR, Brodt P. The Multifaceted Role of the Microenvironment in Liver Metastasis: Biology and Clinical Implications. *Cancer Research*. 2013;73(7):2031-2043. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3931
 262. Eefsen RL, Engelholm L, Willemoe GL, Van Den Eynden GG, Laerum OD, Christensen IJ, Rolff HC, Høyer-Hansen G, Osterlind K, Vainer B, Illemann M. Microvessel density and endothelial cell proliferation levels in colorectal liver metastases from patients given neo-adjuvant cytotoxic chemotherapy and bevacizumab. *International Journal of Cancer*. Published online 2016. doi:10.1002/ijc.29904
 263. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Science*. 2016;352(6282):175-180. doi:10.1126/science.aaf4405
 264. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*. 2015;3:83. doi:10.2147/HP.S93413

265. Saif MW. Anti-VEGF agents in metastatic colorectal cancer (mCRC): Are they all alike? *Cancer Management and Research*. 2013;5(1):103-115. doi:10.2147/CMAR.S45193
266. Giordano G, Remo A, Porras A, Pancione M. Immune resistance and egfr antagonists in colorectal cancer. *Cancers*. 2019;11(8). doi:10.3390/cancers11081089
267. Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, Vermeulen PB, Foo S, Kostaras E, Nathan M, Wotherspoon A, Gao Z-H, Shi Y, Van den Eynden G, Daley F, Peckitt C, Tan X, Salman A, Lazaris A, Gazinska P, Berg TJ, Eltahir Z, Ritsma L, Van Rheenen J, Khashper A, Brown G, Nystrom H, Sund M, Van Laere S, Loyer E, Dirix L, Cunningham D, Metrakos P, Reynolds AR. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases. *Nature medicine*. 2016;22(11):1294-1302. doi:10.1038/nm.4197
268. Van Den Eynden GG, Bird NC, Majeed AW, Van Laere S, Dirix LY, Vermeulen PB. The histological growth pattern of colorectal cancer liver metastases has prognostic value. *Clinical and Experimental Metastasis*. Published online 2012. doi:10.1007/s10585-012-9469-1
269. Ma R, Feng Y, Lin S, Chen J, Lin H, Liang X, Zheng H, Cai X. Mechanisms involved in breast cancer liver metastasis. *Journal of translational medicine*. 2015;13:64. doi:10.1186/s12967-015-0425-0
270. Barnhill R, Vermeulen P, Daelemans S, van Dam P-J, Roman-Roman S, Servois V, Hurbain I, Gardrat S, Raposa G, Nicolas A, Dendale R, Pierron G, Desjardins L, Cassoux N, Piperno-Neumann S, Mariani P, Lugassy C. Replacement and desmoplastic histopathological growth patterns: A pilot study of prediction of outcome in patients with uveal melanoma liver metastases. *The journal of pathology Clinical research*. 2018;4(4):227-240. doi:10.1002/cjp2.105
271. Maru DM, Kopetz S, Boonsirikamchai P, Agarwal A, Chun YS, Wang H, Abdalla EK, Kaur H, Charnsangavej C, Vauthey J-N, Loyer EM. Tumor Thickness at the Tumor-normal Interface: A Novel Pathologic Indicator of Chemotherapy Response in Hepatic Colorectal Metastases. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2010;34(9):1287-1294. doi:10.1097/PAS.0b013e3181eb2f7b
272. Abengózar M, Fernández-Aceñero MJ, Chaves S, Celdrán A. Prognostic utility of tumor thickness at the tumor-normal interface in chemotherapy-treated hepatic colorectal metastasis. *Pathology - Research and Practice*. 2012;208(4):235-239. doi:10.1016/j.prp.2012.02.005
273. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, Jarnagin W, Fong Y, Blumgart L, D'Angelica M, DeMatteo RP. T Cell Infiltrate Predicts Long-Term Survival Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Annals of Surgical Oncology*. 2009;16(9):2524-2530. doi:10.1245/s10434-009-0585-3
274. Wagner P, Koch M, Nummer D, Palm S, Galindo L, Autenrieth D, Schmitz-Winnenthal FH, Schirrmacher V, Büchler MW, Beckhove P, Weitz J, Weitz J. Detection and Functional Analysis of Tumor Infiltrating T-Lymphocytes (TIL) in Liver Metastases from Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2008;15(8):2310-2317. doi:10.1245/s10434-008-9971-5
275. Baran B, Mert Ozupek N, Yerli Tetik N, Acar E, Bekcioglu O, Baskin Y. Difference Between Left-Sided and Right-Sided Colorectal Cancer: A Focused Review of Literature. *Gastroenterology Research*. 2018;11(4):264-273. doi:10.14740/gr1062w
276. Peng J, Li C, Wang F, Zhang H, Xiao W, Li H, Lu Z, Pan Z, Wu X, Zhang R. Right-and left-

- sided stage III colon cancers present different prognostic outcomes of oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy after curative resection. *Cancer Management and Research*. 2018;10:2095-2103. doi:10.2147/CMAR.S163520
277. Wallin U, Rothenberger D, Lowry A, Luepker R, Mellgren A. CEA - A predictor for pathologic complete response after neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*. Published online 2013. doi:10.1097/DCR.0b013e31828e5a72
 278. Kim SH, Chang HJ, Kim DY, Park JW, Baek JY, Kim SY, Park SC, Oh JH, Yu A, Nam BH. What is the ideal tumor regression grading system in rectal cancer patients after preoperative chemoradiotherapy? *Cancer Research and Treatment*. Published online 2016. doi:10.4143/crt.2015.254
 279. Chetty R, Gill P, Govender D, Bateman A, Chang HJ, Deshpande V, Driman D, Gomez M, Greywoode G, Jaynes E, Lee CS, Lockett M, Rowsell C, Rullier A, Serra S, Shepherd N, Szentgyorgyi E, Vajpeyi R, Wang LM, Bateman A. International study group on rectal cancer regression grading: Interobserver variability with commonly used regression grading systems. *Human Pathology*. Published online 2012. doi:10.1016/j.humpath.2012.01.020
 280. Dawson H, Kirsch R, Messenger D, Driman D. A review of current challenges in colorectal cancer reporting. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2019;143(7):869-882. doi:10.5858/arpa.2017-0475-RA
 281. Washington MK, Tang LH, Berlin J, Branton PA, Burgart LJ, Carter DK, Compton CC, Fitzgibbons PL, Frankel WL, Jessup JM, Kakar S, Minsky B, Nakhleh RE. Protocol for the examination of specimens from patients with neuroendocrine tumors (Carcinoid Tumors) of the colon and rectum. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. Published online 2010. doi:10.1043/1543-2165-133.10.1539
 282. Amri R, Bordeianou LG, Sylla P, Berger DL. Association of radial margin positivity with colon cancer. *JAMA Surgery*. Published online 2015. doi:10.1001/jamasurg.2015.1525
 283. Park JS, Sakai Y, Simon NSM, Law WL, Kim HR, Oh JH, Shan HCY, Kwak SG, Choi GS. Long-term survival and local relapse following surgery without radiotherapy for locally advanced upper rectal cancer. *Medicine (United States)*. Published online 2016. doi:10.1097/MD.0000000000002990
 284. Prats MM, Sasatomi E, Stevenson HL. Colorectal Liver Metastases A Pathologist's Guide to Creating an Informative Report and Improving Patient Care. doi:10.5858/arpa.2017-0505-RA
 285. Chan G, Hassanain M, Chaudhury P, Vrochides D, Neville A, Cesari M, Kavan P, Marcus V, Metrakos P. Pathological response grade of colorectal liver metastases treated with neoadjuvant chemotherapy. *HPB*. Published online 2010. doi:10.1111/j.1477-2574.2010.00170.x
 286. Chen S, Song X, Chen Z, Li X, Li M, Liu H, Li J. CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. Published online 2013. doi:10.1371/journal.pone.0056380
 287. Schweiger MR, Hussong M, Röhr C, Lehrach H. Genomics and epigenomics of colorectal cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. Published online 2013. doi:10.1002/wsbm.1206
 288. Grizzi F, Di Caro G, Marchesi F, Laghi L. Prognostic value of innate and adaptive immunity

- in cancers. In: *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context.* ; 2015. doi:10.1007/978-3-662-44006-3_15
289. Hu H, Sun L, Guo C, Liu Q, Zhou Z, Peng L, Pan J, Yu L, Lou J, Yang Z, Zhao P, Ran Y. Tumor cell-microenvironment interaction models coupled with clinical validation reveal CCL2 and SNCG as two predictors of colorectal cancer hepatic metastasis. *Clinical Cancer Research*. Published online 2009. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2491
 290. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer KL, Baldus SE, Huckenbeck W, Piekorz RP, Knoefel WT, Krieg A, Stoecklein NH. Impact of the 3D Microenvironment on Phenotype, Gene Expression, and EGFR Inhibition of Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*. Published online 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059689
 291. Jiang H, Verovski VN, Leonard W, Law KL, Vermeersch M, Storme G, Van Den Berge D, Gevaert T, Sermeus A, De Ridder M. Hepatocytes determine the hypoxic microenvironment and radiosensitivity of colorectal cancer cells through production of nitric oxide that targets mitochondrial respiration. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. Published online 2013. doi:10.1016/j.ijrobp.2012.07.2359
 292. Belluco C, Mammano E, Petricoin E, Prevedello L, Calvert V, Liotta L, Nitti D, Lise M. Kinase substrate protein microarray analysis of human colon cancer and hepatic metastasis. *Clinica Chimica Acta*. Published online 2005. doi:10.1016/j.cccn.2005.03.024
 293. Achyut BR, Yang L. Transforming growth factor- β in the gastrointestinal and hepatic tumor microenvironment. *Gastroenterology*. Published online 2011. doi:10.1053/j.gastro.2011.07.048
 294. Wu Y, Brodt P, Sun H, Mejia W, Novosyadlyy R, Nunez N, Chen X, Mendoza A, Hong SH, Khanna C, Yakar S. Insulin-like growth factor-I regulates the liver microenvironment in obese mice and promotes liver metastasis. *Cancer Research*. Published online 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2472
 295. Background on Comparative Genomic Analysis - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Accessed October 28, 2018. <https://www.genome.gov/10005835/background-on-comparative-genomic-analysis/>
 296. Cekanova M, Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: Utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy*. 2014;8:1911-1922. doi:10.2147/DDDT.S49584
 297. Background on the History of the Mouse - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Accessed October 28, 2018. <https://www.genome.gov/10005832/background-on-the-history-of-the-mouse/>
 298. Background on Mouse as a Model Organism - National Human Genome Research Institute (NHGRI). Accessed October 28, 2018. <https://www.genome.gov/10005834/background-on-mouse-as-a-model-organism/>
 299. White SB, Procissi D, Chen J, Gogineni VR, Tyler P, Yang Y, Omary RA, Larson AC. Characterization of CC-531 as a rat model of colorectal liver metastases. *PLoS ONE*. Published online 2016. doi:10.1371/journal.pone.0155334
 300. O'Rourke KP, Loizou E, Livshits G, Schatoff EM, Baslan T, Manchado E, Simon J, Romesser PB, Leach B, Han T, Pauli C, Beltran H, Rubin MA, Dow LE, Lowe SW. Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer. *Nature Biotechnology*. Published online 2017. doi:10.1038/nbt.3837

301. Fidler IJ, Kripke ML. The challenge of targeting metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. Published online 2015. doi:10.1007/s10555-015-9586-9
302. Lorenz E, Stewart HL. Intestinal carcinoma and other lesions in mice following oral administration of 1,2,5,6-dibenzanthracene and 20-methylcholanthrene. *Journal of the National Cancer Institute*. Published online 1940. doi:10.1093/jnci/1.1.17
303. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2009;30(2):183-196. doi:10.1093/carcin/bgn267
304. WALPOLE AL, WILLIAMS MHC, ROBERTS DC. The carcinogenic action of 4-aminodiphenyl and 3:2'-dimethyl-4-amino-diphenyl. *British journal of industrial medicine*. 1952;9(4):255-263. Accessed October 28, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12987579>
305. LAQUEUR GL, MICKELSEN O, WHITING MG, KURLAND LT. CARCINOGENIC PROPERTIES OF NUTS FROM CYCAS CIRCINALIS L. INDIGENOUS TO GUAM. *Journal of the National Cancer Institute*. 1963;31:919-951. Accessed October 28, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14069834>
306. LAQUEUR GL. CARCINOGENIC EFFECTS OF CYCAD MEAL AND CYCASIN, METHYLAZOXYMETHANOL GLYCOSIDE, IN RATS AND EFFECTS OF CYCASIN IN GERMFREE RATS. *Federation proceedings*. 23:1386-1388. Accessed October 28, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14236160>
307. Druckrey H, Preussmann R, Matzkies F, Ivankovic S. [Selective production of intestinal cancer in rats by 1,2-dimethylhydrazine]. *Die Naturwissenschaften*. 1967;54(11):285-286. Accessed October 28, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5589923>
308. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology*. Published online 1990. doi:10.1016/0016-5085(90)90290-H
309. Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*. Published online 2002. doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02853.x
310. Boni L, Benevento A, Dionigi G, Rovera F, Diurni M, Dionigi R. Injection of colorectal cancer cells in mesenteric and antimesenteric sides of the colon results in different patterns of metastatic diffusion: An experimental study in rats. *World Journal of Surgical Oncology*. Published online 2005. doi:10.1186/1477-7819-3-69
311. Brown KM, Xue A, Mittal A, Samra JS, Smith R, Hugh TJ. Patient-derived xenograft models of colorectal cancer in pre-clinical research: a systematic review. *Oncotarget*. Published online 2016. doi:10.18632/oncotarget.11184
312. Schoffelen R, van der Graaf WTA, Sharkey RM, Franssen GM, McBride WJ, Chang C-H, Bos DL, Goldenberg DM, Oyen WJG, Boerman OC. Quantitative Immuno-SPECT Monitoring of Pretargeted Radioimmunotherapy with a Bispecific Antibody in an Intraperitoneal Nude Mouse Model of Human Colon Cancer. *Journal of Nuclear Medicine*. Published online 2012. doi:10.2967/jnumed.112.106278
313. Talmadge JE, Singh RK, Fidler IJ, Raz A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *American Journal of Pathology*. Published online 2007. doi:10.2353/ajpath.2007.060929

314. Qiu C, Li Y, Liang X, Qi Y, Chen Y, Meng X, Zheng H, Xu Y, Cai S, Cai G, Liu J. A study of peritoneal metastatic xenograft model of colorectal cancer in the treatment of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with Raltitrexed. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;92:149-156. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.053
315. Young M, Ordonez L, Clarke AR. What are the best routes to effectively model human colorectal cancer? *Molecular Oncology*. Published online 2013. doi:10.1016/j.molonc.2013.02.006
316. de la Cueva A, Ramírez de Molina A, Álvarez-Ayerza N, Ramos MA, Cebrián A, Pulgar TG del, Lacal JC. Combined 5-FU and ChoK α Inhibitors as a New Alternative Therapy of Colorectal Cancer: Evidence in Human Tumor-Derived Cell Lines and Mouse Xenografts. *PLoS ONE*. Published online 2013. doi:10.1371/journal.pone.0064961
317. Abuqayyas L, Balthasar JP. Application of PBPK modeling to predict monoclonal antibody disposition in plasma and tissues in mouse models of human colorectal cancer. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Published online 2012. doi:10.1007/s10928-012-9279-8
318. Bradshaw-Pierce EL, Pitts TM, Kulikowski G, Selby H, Merz AL, Gustafson DL, Serkova NJ, Eckhardt SG, Weekes CD. Utilization of Quantitative In Vivo Pharmacology Approaches to Assess Combination Effects of Everolimus and Irinotecan in Mouse Xenograft Models of Colorectal Cancer. *PLoS ONE*. Published online 2013. doi:10.1371/journal.pone.0058089
319. Lim C, Broqueres-You D, Brouland J-P, Merkulova-Rainon T, Faussat A-M, Hilal R, Rouquie D, Eveno C, Audollent R, Levy BI, Pocard M. Hepatic ischemia-reperfusion increases circulating bone marrow-derived progenitor cells and tumor growth in a mouse model of colorectal liver metastases. *Journal of Surgical Research*. Published online 2013. doi:10.1016/j.jss.2013.04.069
320. Xu B, Zhu G-H, Cai W-S, Li G-H, Gu W-L, Jia L, Shen B. Interleukin-12 prevents colorectal cancer liver metastases in mice. *OncoTargets and Therapy*. 2013;6:523. doi:10.2147/OTT.S44161
321. Huang X, Zou Y, Lian L, Wu X, He X, He X, Wu X, Huang Y, Lan P. Changes of T Cells and Cytokines TGF- β 1 and IL-10 in Mice During Liver Metastasis of Colon Carcinoma: Implications for Liver Anti-tumor Immunity. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. Published online 2013. doi:10.1007/s11605-013-2194-5
322. Marchal F, Tran N, Marchal S, Leroux A, Marchal C, Bolotine L, Guillemin F, Villemot JP. Development of an HT29 liver metastases model in nude rats. *Oncology reports*. Published online 2005. doi:10.1071/MF98139
323. Thalheimer A, Otto C, Bueter M, Illert B, Gattenlohner S, Gasser M, Fein M, Germer CT, Waaga-Gasser AM. Tumor cell dissemination in a human colon cancer animal model: Orthotopic implantation or intraportal injection? *European Surgical Research*. Published online 2009. doi:10.1159/000205825
324. Frampas E, Maurel C, Thedrez P, Remaud-Le Saëc P, Faivre-Chauvet A, Barbet J. The intraportal injection model for liver metastasis. *Nuclear Medicine Communications*. 2011;32(2):147-154. doi:10.1097/MNM.0b013e328341b268
325. Schuh JCL. Trials, Tribulations, and Trends in Tumor Modeling in Mice. *Toxicologic Pathology*. Published online 2004. doi:10.1080/01926230490424770

326. Jobin C. Colorectal cancer: CRC - All about microbial products and barrier function? *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Published online 2012. doi:10.1038/nrgastro.2012.220
327. Kruse J, Von Bernstorff W, Evert K, Albers N, Hadlich S, Hagemann S, Günther C, Van Rooijen N, Heidecke CD, Partecke LI. Macrophages promote tumour growth and liver metastasis in an orthotopic syngeneic mouse model of colon cancer. *International Journal of Colorectal Disease*. Published online 2013. doi:10.1007/s00384-013-1703-z
328. Xu Q, Guo L, Gu X, Zhang B, Hu X, Zhang J, Chen J, Wang Y, Chen C, Gao B, Kuang Y, Wang S. Prevention of colorectal cancer liver metastasis by exploiting liver immunity via chitosan-TPP/nanoparticles formulated with IL-12. *Biomaterials*. 2012;33(15):3909-3918. doi:10.1016/j.BIOMATERIALS.2012.02.014
329. Gao W, Chen L, Ma Z, Du Z, Zhao Z, Hu Z, Li Q. Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology*. Published online 2013. doi:10.1053/j.gastro.2013.05.049
330. Gemei M, Mirabelli P, Di Noto R, Corbo C, Iaccarino A, Zamboli A, Troncone G, Galizia G, Lieto E, Del Vecchio L, Salvatore F. CD66c is a novel marker for colorectal cancer stem cell isolation, and its silencing halts tumor growth in vivo. *Cancer*. 2013;119(4):729-738. doi:10.1002/cncr.27794
331. Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, Xu P, Kerbel RS. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nature Reviews Cancer*. Published online 2011. doi:10.1038/nrc3001
332. Bresalier RS, Itzkowitz SH, Kim YS, Raper SE, Roll FJ, Hujanen ES, Martin GR. An Animal Model for Colon Cancer Metastasis: Establishment and Characterization of Murine Cell Lines with Enhanced Liver-metastasizing Ability. *Cancer Research*. Published online 1987. doi:10.1016/j.aquatox.2017.06.012
333. Metildi CA, Kaushal S, Snyder CS, Hoffman RM, Bouvet M. Fluorescence-guided surgery of human colon cancer increases complete resection resulting in cures in an orthotopic nude mouse model. *Journal of Surgical Research*. Published online 2013. doi:10.1016/j.jss.2012.08.052
334. Cohen G, Lecht S, Arien-Zakay H, Ettinger K, Amsalem O, Oron-Herman M, Yavin E, Prus D, Benita S, Nissan A, Lazarovici P. Bio-Imaging of Colorectal Cancer Models Using Near Infrared Labeled Epidermal Growth Factor. *PLoS ONE*. Published online 2012. doi:10.1371/journal.pone.0048803
335. Devaud C, Rousseau B, Netzer S, Pitard V, Paroissin C, Khairallah C, Costet P, Moreau J-F, Couillaud F, Dechanet-Merville J, Capone M. Anti-metastatic potential of human V δ 1+ $\gamma\delta$ T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013;62(7):1199-1210. doi:10.1007/s00262-013-1402-1
336. Chen Q, Chen L, Zhao R, Yang XD, Imran K, Xing CG. Microarray analyses reveal liver metastasis-related genes in metastatic colorectal cancer cell model. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. Published online 2013. doi:10.1007/s00432-013-1424-2
337. Chowdhury S, Ongchin M, Wan G, Sharratt E, Brattain MG, Rajput A. Restoration of PTEN activity decreases metastases in an orthotopic model of colon cancer. *Journal of Surgical Research*. Published online 2013. doi:10.1016/j.jss.2013.03.035
338. Washington MK, Powell AE, Sullivan R, Sundberg JP, Wright N, Coffey RJ, Dove WF.

- Pathology of rodent models of intestinal cancer: Progress report and recommendations. *Gastroenterology*. Published online 2013. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.067
339. Li F, Lai M. Colorectal cancer, one entity or three. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. Published online 2009. doi:10.1631/jzus.B0820273
340. Ferretti G, Felici A, Cognetti F, Mandala M. Is there a right-sided shift for colorectal cancer in women compared with men? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(5):1054. doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0039
341. Gervaz P, Bucher P, Morel P. Two colons-two cancers: Paradigm shift and clinical implications. *Journal of Surgical Oncology*. Published online 2004. doi:10.1002/jso.20156
342. Iacopetta B. Are there two sides to colorectal cancer? *International Journal of Cancer*. Published online 2002. doi:10.1002/ijc.10635
343. Meguid RA, Slidell MB, Wolfgang CL, Chang DC, Ahuja N. Is there a difference in survival between right- versus left-sided colon cancers? *Annals of Surgical Oncology*. Published online 2008. doi:10.1245/s10434-008-0015-y
344. Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Ørntoft TF. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut*. Published online 2005. doi:10.1136/gut.2003.036848
345. Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, Jenkins J, Cliatt J, Humbyrd CJ, DeNobile J, Soballe P, Simon R, Wright G, Lynch P, Patterson S, Lynch H, Gallinger S, Buchbinder A, Gordon G, Hawk E, Kirsch IR. Distinguishing right from left colon by the pattern of gene expression. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. Published online 2003.
346. Frattini M, Balestra D, Suardi S, Oggionni M, Alberici P, Radice P, Costa A, Daidone MG, Leo E, Pilotti S, Bertario L, Pierotti MA. Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. *Clinical Cancer Research*. Published online 2004. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0031
347. Minoo P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *International Journal of Oncology*. Published online 2010. doi:10.3892/ijo-00000720
348. Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Boucher KM, Sweeney C, Edwards S, Caan BJ, Samowitz W. A comparison of colon and rectal somatic DNA alterations. *Diseases of the Colon and Rectum*. Published online 2009. doi:10.1007/DCR.0b013e3181a0e5df
349. Priolli DG, Abrantes AM, Neves S, Batista JN, Cardinali IA, Botelho MF. A novel model of distal colon cancer in athymic mice. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2012;27(6):355-360. doi:10.1590/S0102-86502012000600001
350. Malgras B, Brullé L, Lo Dico R, El Marjou F, Robine S, Therwath A, Pocard M. Insertion of a Stent in Obstructive Colon Cancer Can Induce a Metastatic Process in an Experimental Murine Model. *Annals of Surgical Oncology*. 2015;22(S3):1475-1480. doi:10.1245/s10434-015-4588-y
351. Ellis L, Lehet K, Ku S, Azabdaftari G, Pili R. Generation of a syngeneic orthotopic transplant model of prostate cancer metastasis. *Oncoscience*. Published online 2014. doi:10.18632/oncoscience.88

352. Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, Decker M, Mittal VK. A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *Journal of the American College of Surgeons*. Published online 2011. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2011.02.022
353. Day CP, Merlino G, Van Dyke T. Preclinical Mouse Cancer Models: A Maze of Opportunities and Challenges. *Cell*. Published online 2015. doi:10.1016/j.cell.2015.08.068
354. Puig I, Chicote I, Tenbaum SP, Arqués O, Herance JR, Gispert JD, Jimenez J, Landolfi S, Caci K, Allende H, Mendizabal L, Moreno D, Charco R, Espín E, Prat A, Elez ME, Argilés G, Vivancos A, Tabernero J, Rojas S, Palmer HG. A personalized preclinical model to evaluate the metastatic potential of patient-derived colon cancer initiating cells. *Clinical Cancer Research*. Published online 2013. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1740
355. Hoffman RM. Patient-derived orthotopic xenografts: Better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature Reviews Cancer*. Published online 2015. doi:10.1038/nrc3972
356. Dangles-Marie V, Pocard M, Richon S, Weiswald LB, Assayag F, Saulnier P, Judde JG, Janneau JL, Auger N, Validire P, Dutrillaux B, Praz F, Bellet D, Poupon MF. Establishment of human colon cancer cell lines from fresh tumors versus xenografts: Comparison of success rate and cell line features. *Cancer Research*. Published online 2007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0594
357. Hidalgo M, Amant F, Biankin A V., Budinská E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Mælandsmo GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A. Patient-derived Xenograft models: An emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discovery*. Published online 2014. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0001
358. Isella C, Terrasi A, Bellomo SE, Petti C, Galatola G, Muratore A, Mellano A, Senetta R, Cassenti A, Sonetto C, Inghirami G, Trusolino L, Fekete Z, De Ridder M, Cassoni P, Storme G, Bertotti A, Medico E. Stromal contribution to the colorectal cancer transcriptome. *Nature Genetics*. Published online 2015. doi:10.1038/ng.3224
359. Rosfjord E, Lucas J, Li G, Gerber HP. Advances in patient-derived tumor xenografts: From target identification to predicting clinical response rates in oncology. *Biochemical Pharmacology*. Published online 2014. doi:10.1016/j.bcp.2014.06.008
360. Walsh NC, Kenney LL, Jangalwe S, Aryee K-E, Greiner DL, Brehm MA, Shultz LD. Humanized Mouse Models of Clinical Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2017;12(1):187-215. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100332
361. Julien S, Merino-Trigo A, Lacroix L, Pocard M, Goéré D, Mariani P, Landron S, Bigot L, Nemati F, Dartigues P, Weiswald LB, Lantuas D, Morgand L, Pham E, Gonin P, Dangles-Marie V, Job B, Dessen P, Bruno A, Pierré A, De Thé H, Soliman H, Nunes M, Lardier G, Calvet L, Demers B, Prévost G, Vrignaud P, Roman-Roman S, Duchamp O, Berthet C. Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. Published online 2012. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-0372
362. Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. In: *Clinical Cancer Research*. ; 2003. doi:10.1111/j.1532-5415.2011.03779.x
363. McIntyre RE, Buczacki SJAA, Arends MJ, Adams DJ. Mouse models of colorectal cancer as

- preclinical models. *BioEssays*. 2015;37(8):909-920. doi:10.1002/bies.201500032
364. Kuraguchi M, Yang K, Wong E, Avdievich E, Fan K, Kolodner RD, Lipkin M, Brown AM, Kucherlapati R, Edelmann W. The distinct spectra of tumor-associated Apc mutations in mismatch repair-deficient Apc1638N mice define the roles of MSH3 and MSH6 in DNA repair and intestinal tumorigenesis. *Cancer research*. 2001;61(21):7934-7942. Accessed October 29, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691815>
 365. Casorelli I, Pannellini T, De Luca G, Degan P, Chiera F, Iavarone I, Giuliani A, Butera A, Boirivant M, Musiani P, Bignami M. The Mutyh base excision repair gene influences the inflammatory response in a mouse model of ulcerative colitis. *PloS one*. 2010;5(8):e12070. doi:10.1371/journal.pone.0012070
 366. Orner GA, Dashwood WM, Blum CA, Díaz GD, Li Q, Dashwood RH. Suppression of tumorigenesis in the Apcmin mouse: Down-regulation of β -catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis*. Published online 2003. doi:10.1093/carcin/24.2.263
 367. Cooper K, Squires H, Carroll C, Papaioannou D, Booth A, Logan R, Maguire C, Hind D, Tappenden P. Chemoprevention of colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*. 2010;14(32):1-206. doi:10.3310/hta14320
 368. Albuquerque C, Breukel C, van der Luijt R, Fidalgo P, Lage P, Slors FJM, Leitão CN, Fodde R, Smits R. The “just-right” signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Human molecular genetics*. 2002;11(13):1549-1560. Accessed October 29, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045208>
 369. Petrova T V., Nykänen A, Norrmén C, Ivanov KI, Andersson LC, Haglund C, Puolakkainen P, Wempe F, von Melchner H, Gradwohl G, Vanharanta S, Aaltonen LA, Saharinen J, Gentile M, Clarke A, Taipale J, Oliver G, Alitalo K. Transcription Factor PROX1 Induces Colon Cancer Progression by Promoting the Transition from Benign to Highly Dysplastic Phenotype. *Cancer Cell*. Published online 2008. doi:10.1016/j.ccr.2008.02.020
 370. Dopeso H, Mateo-Lozano S, Mazzolini R, Rodrigues P, Lagares-Tena L, Ceron J, Romero J, Esteves M, Landolfi S, Hernández-Losa J, Castaño J, Wilson AJ, Ramon Y Cajal S, Mariadason JM, Schwartz S, Arango D. The receptor tyrosine kinase EPHB4 has tumor suppressor activities in intestinal tumorigenesis. *Cancer Research*. Published online 2009. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0706
 371. Heijstek MW, Kranenburg O, Rinkes IHMB. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Digestive Surgery*. Published online 2005. doi:10.1159/000085342
 372. Taketo MM, Edelmann W. Mouse models of colon cancer. *Gastroenterology*. 2009;136(3):780-798. Accessed October 29, 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19263594>
 373. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*. Published online 2015. doi:10.1242/dmm.017400
 374. Francia G, Kerbel RS. Raising the bar for cancer therapy models. *Nature Biotechnology*. Published online 2010. doi:10.1038/nbt0610-561
 375. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, Berry DA. Meta-Analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes and Control*. Published online 2013.

- doi:10.1007/s10552-013-0201-5
376. Zhang L, Zhao Y, Dai Y, Cheng JN, Gong Z, Feng Y, Sun C, Jia Q, Zhu B. Immune landscape of colorectal cancer tumor microenvironment from different primary tumor location. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(JUL). doi:10.3389/fimmu.2018.01578
 377. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. In: *Cancer Microenvironment*. Vol 3. ; 2010:149-166. doi:10.1007/s12307-010-0038-3
 378. Bhome R, Mellone M, Emo K, Thomas GJ, Sayan AE, Mirnezami AH. The colorectal cancer microenvironment: Strategies for studying the role of cancer-associated fibroblasts. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol 1765. Humana Press Inc.; 2018:87-98. doi:10.1007/978-1-4939-7765-9_6
 379. Fassan M, Vianello L, Sacchi D, Fanelli GN, Munari G, Scarpa M, Cappellesso R, Loupakis F, Lanza C, Salmaso R, Mescoli C, Valeri N, Agostini M, D'Angelo E, Lonardi S, Pucciarelli S, Veronese N, Luchini C, Rugge M. Assessment of intratumor immune-microenvironment in colorectal cancers with extranodal extension of nodal metastases. *Cancer Cell International*. 2018;18(1):131. doi:10.1186/s12935-018-0634-8
 380. Gout S, Huot J. Role of cancer microenvironment in metastasis: Focus on colon cancer. *Cancer Microenvironment*. 2008;1(1):69-83. doi:10.1007/s12307-008-0007-2
 381. Giordano G, Febbraro A, Venditti M, Campidoglio S, Olivieri N, Raieta K, Parcesepe P, Imbriani GC, Remo A, Pancione M. Targeting Angiogenesis and Tumor Microenvironment in Metastatic Colorectal Cancer: Role of Aflibercept. *Gastroenterology Research and Practice*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/526178
 382. Wang N, Wang S, Li M-Y, Hu B-G, Liu L-P, Yang S-L, Yang S, Gong Z, Lai PBS, Chen GG. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2018;10:1758835918816287. doi:10.1177/1758835918816287
 383. Roma-Rodrigues C, Mendes R, Baptista P V., Fernandes AR. Targeting tumor microenvironment for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(4). doi:10.3390/ijms20040840
 384. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen Y-J, Ciombor KK, Cohen S, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffe S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Meyerhardt J, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, Willett CG, Wuthrick E, Gregory KM, Gurski L, Freedman-Cass DA. Rectal Cancer, Version 2.2018, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*. 2018;16(7):874-901. doi:10.6004/jnccn.2018.0061
 385. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Cederquist L, Chen Y-J, Ciombor KK, Cohen S, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Garrido-Laguna I, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffe S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Meyerhardt J, Miller ED, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, Willett CG, Wuthrick E, Gregory KM, Freedman-Cass DA. NCCN Guidelines Insights: Colon Cancer, Version 2.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*. 2018;16(4):359-369. doi:10.6004/jnccn.2018.0021

386. Vogel JD, Eskicioglu C, Weiser MR, Feingold DL, Steele SR. The American society of colon and rectal surgeons clinical practice guidelines for the treatment of colon cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2017;60(10):999-1017. doi:10.1097/DCR.0000000000000926
387. Koelzer VH, Lugli A. The Tumor Border Configuration of Colorectal Cancer as a Histomorphological Prognostic Indicator. *Frontiers in Oncology*. 2014;4:29. doi:10.3389/fonc.2014.00029
388. Schneider NI, Langner C. Prognostic stratification of colorectal cancer patients: Current perspectives. *Cancer Management and Research*. Published online 2014. doi:10.2147/CMAR.S38827
389. Fernández-Aceñero MJ, Galindo-Gallego M, Sanz J, Aljama A. Prognostic influence of tumor-associated eosinophilic infiltrate in colorectal carcinoma. *Cancer*. Published online 2000. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(20000401)88:7<1544::AID-CNCR7>3.0.CO;2-S
390. Balmaña J, Balaguer F, Cervantes A, Arnold D. Familial risk-colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines †. *Annals of Oncology*. 2013;24:73-80. doi:10.1093/annonc/mdt209
391. Akshatha C A, Mysorekar V, Arundhathi S A, Arul P A, Raj A, Shetty S. Correlation of p53 Overexpression with the Clinicopathological Prognostic Factors in Colorectal Adenocarcinoma. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2016;10(12):EC05-EC08. doi:10.7860/JCDR/2016/22617.9056
392. Sconocchia G, Eppenberger S, Spagnoli GC, Tornillo L, Drosner R, Caratelli S, Ferrelli F, Coppola A, Arriga R, Lauro D, Iezzi G, Terracciano L, Ferrone S. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2014;3(8):e952197. doi:10.4161/21624011.2014.952197
393. Riely GL. What, When, and How of Biomarker Testing in Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2017;15(5S):686-688. doi:10.6004/JNCCN.2017.0073
394. Cree IA, Booton R, Cane P, Gosney J, Ibrahim M, Kerr K, Lal R, Lewanski C, Navani N, Nicholson AG, Nicolson M, Summers Y. PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology*. 2016;69(2):177-186. doi:10.1111/his.12996
395. Paulsen E-E, Kilvaer TK, Khanekkenari MR, Al-Saad S, Hald SM, Andersen S, Richardsen E, Ness N, Busund L-T, Bremnes RM, Donnem T. Assessing PDL-1 and PD-1 in Non-Small Cell Lung Cancer: A Novel Immunoscore Approach. *Clinical Lung Cancer*. 2017;18(2):220-233.e8. doi:10.1016/J.CLLC.2016.09.009
396. Adam R, De Gramont A, Figueras J, Guthrie A, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Tabernero J, Teh C, Van Cutsem E. The Oncosurgery Approach to Managing Liver Metastases from Colorectal Cancer: A Multidisciplinary International Consensus. *The Oncologist*. 2012;17(10):1225-1239. doi:10.1634/theoncologist.2012-0121
397. Kim Y II, Park IJ, Kim JE, Kim SY, Park JH, Lee JH, Ha TY, Hong YS, Kim SY, Kim TW, Lim SB, Yu CS, Kim JC. Hepatic resection after neoadjuvant chemotherapy for patients with liver metastases from colorectal cancer: Need for cautious planning. *Annals of Surgical Treatment and Research*. 2019;97(5):245-253. doi:10.4174/astr.2019.97.5.245

398. Makowiec F, Bronsert P, Klock A, Hopt UT, Neeff HP. Prognostic influence of hepatic margin after resection of colorectal liver metastasis: role of modern preoperative chemotherapy. *International Journal of Colorectal Disease*. 2018;33(1):71-78. doi:10.1007/s00384-017-2916-3
399. Zhou F, Yu X, Liang P, Han Z, Cheng Z, Yu J, Liu F, Hu Y. Does primary tumor location impact the prognosis of colorectal liver metastases patients after microwave ablation? - Lessons from 10 years' experience. *Oncotarget*. 2017;8(59):100791-100800. doi:10.18632/oncotarget.18764
400. Su Park J, Chul Park H, Ho Choi D, Park W, Il Yu J, Suk Park Y, Ki Kang W, Oh Park J. Prognostic and predictive value of liver volume in colorectal cancer patients with unresectable liver metastases. *Radiat Oncol J*. 2014;32(2):77-83. doi:10.3857/roj.2014.32.2.77
401. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Ducreux M, Falcone A, Grothey A, Gruenberger T, Haustermans K, Heinemann V, Hoff P, Köhne CH, Labianca R, Laurent-Puig P, Ma B, Maughan T, Muro K, Normanno N, österlund P, Oyen WJG, Papamichael D, Pentheroudakis G, Pfeiffer P, Price TJ, Punt C, Ricke J, Roth A, Salazar R, Scheithauer W, Schmoll HJ, Tabernero J, Taïeb J, Tejpar S, Wasan H, Yoshino T, Zaanan A, Arnold D. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. Published online 2016. doi:10.1093/annonc/mdw235
402. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, Pentheroudakis G, Yamazaki K, Xu RH, Kim TW, Ismail F, Tan IB, Yeh KH, Grothey A, Zhang S, Ahn JB, Mastura MY, Chong D, Chen LT, Kopetz S, Eguchi-Nakajima T, Ebi H, Ohtsu A, Cervantes A, Muro K, Tabernero J, Minami H, Ciardiello F, Douillard JY. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: A JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Annals of Oncology*. Published online 2018. doi:10.1093/annonc/mdx738
403. Ratti F, Cipriani F, Catena M, Paganelli M, Aldrighetti L. Liver failure in patients treated with chemotherapy for colorectal liver metastases: Role of chronic disease scores in patients undergoing major liver surgery. A case-matched analysis. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2014;40(11):1550-1556. doi:10.1016/j.ejso.2014.06.011
404. Tralhão JG, Hoti E, Oliveiros B, Abrantes AM, Botelho MF, Castro-Sousa F. Intermittent pringle maneuver and hepatic function: Perioperative monitoring by noninvasive ICG-clearance. *World Journal of Surgery*. Published online 2009. doi:10.1007/s00268-009-0204-2
405. 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. *Annals of Surgery*. 2004;240(2):205-213. doi:10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae
406. Balzan S, Belghiti J, Farges O, Ogata S, Sauvanet A, Delefosse D, Durand F, Sloof, Rikkers, Clavien, Höckerstedt. The "50-50 criteria" on postoperative day 5: An accurate predictor of liver failure and death after hepatectomy. In: *Annals of Surgery*. Vol 242. ; 2005:824-829. doi:10.1097/01.sla.0000189131.90876.9e
407. Adam R, Chiche L, Aloia T, Elias D, Salmon R, Rivoire M, Jaeck D, Saric J, Le Treut YP,

- Belghiti J, Mantion G, Mentha G, Association Française de Chirurgie. Hepatic resection for noncolorectal nonendocrine liver metastases: analysis of 1,452 patients and development of a prognostic model. *Annals of surgery*. 2006;244(4):524-535. doi:10.1097/01.sla.0000239036.46827.5f
408. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Brooke-Smith M, Crawford M, Adam R, Koch M, Makuuchi M, Dematteo RP, Christophi C, Banting S, Usatoff V, Nagino M, Maddern G, Hugh TJ, Vauthey J-N, Greig P, Rees M, Yokoyama Y, Fan ST, Nimura Y, Figueras J, Capussotti L, Büchler MW, Weitz J. Posthepatectomy liver failure: A definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *Surgery*. 2011;149(5):713-724. doi:10.1016/j.surg.2010.10.001
409. Koch M, Garden OJ, Padbury R, Rahbari NN, Adam R, Capussotti L, Fan ST, Yokoyama Y, Crawford M, Makuuchi M, Christophi C, Banting S, Brooke-Smith M, Usatoff V, Nagino M, Maddern G, Hugh TJ, Vauthey J-N, Greig P, Rees M, Nimura Y, Figueras J, DeMatteo RP, Büchler MW, Weitz J. Bile leakage after hepatobiliary and pancreatic surgery: a definition and grading of severity by the International Study Group of Liver Surgery. *Surgery*. 2011;149(5):680-688. doi:10.1016/j.surg.2010.12.002
410. Rahbari NN, Garden OJ, Padbury R, Maddern G, Koch M, Hugh TJ, Fan ST, Nimura Y, Figueras J, Vauthey JN, Rees M, Adam R, Dematteo RP, Greig P, Usatoff V, Banting S, Nagino M, Capussotti L, Yokoyama Y, Brooke-Smith M, Crawford M, Christophi C, Makuuchi M, Büchler MW, Weitz J. Post-hepatectomy haemorrhage: A definition and grading by the International Study Group of Liver Surgery (ISGLS). *HPB*. 2011;13(8):528-535. doi:10.1111/j.1477-2574.2011.00319.x
411. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric cancer: official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2011;14(2):101-112. doi:10.1007/s10120-011-0041-5
412. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods*. 2004;294(1-2):15-22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
413. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular immunology*. 2009;254(2):149-154. doi:10.1016/j.cellimm.2008.08.007
414. Hewitt SM, Baskin DG, Frevert CW, Stahl WL, Rosa-Molinar E. Controls for Immunohistochemistry: The Histochemical Society's Standards of Practice for Validation of Immunohistochemical Assays. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2014;62(10):693-697. doi:10.1369/0022155414545224
415. Wolff AC, Elizabeth M, Hammond H, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, Mcshane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, Van De Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF, Wolff M, Elizabeth H, Hammond JN, Schwartz DF. *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer*. Vol 131.; 2007. Accessed October 27, 2019. <http://arpa.allenpress.com>
416. Torlakovic EE, Nielsen S, Vyberg M, Taylor CR. Getting controls under control: the time is now for immunohistochemistry. *Journal of clinical pathology*. 2015;68(11):879-882. doi:10.1136/jclinpath-2014-202705
417. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J,

- Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 1998;4(7):844-847. doi:10.1038/nm0798-844
418. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAS) for high-throughput molecular pathology research. *International Journal of Cancer*. 2001;94(1):1-5. doi:10.1002/ijc.1385
419. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, Visser O, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*. 2018;103:356-387. doi:10.1016/j.ejca.2018.07.005
420. Siegel RL, Torre LA, Soerjomataram I, Hayes RB, Bray F, Weber TK, Jemal A. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults. *Gut*. 2019;68(12):2179-2185. doi:10.1136/gutjnl-2019-319511
421. Sharp L, O'Leary E, O'Ceilleachair A, Skally M, Hanly P. Financial Impact of Colorectal Cancer and Its Consequences: Associations between Cancer-Related Financial Stress and Strain and Health-Related Quality of Life. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2018;61(1):27-35. doi:10.1097/DCR.0000000000000923
422. Abelson JS, Michelassi F, Sun T, Mao J, Milsom J, Samstein B, Sedrakyan A, Yeo HL. Simultaneous Resection for Synchronous Colorectal Liver Metastasis: the New Standard of Care? *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2017;21(6):975-982. doi:10.1007/s11605-017-3422-1
423. Paschos KA, Majeed AW, Bird NC. Natural history of hepatic metastases from colorectal cancer - Pathobiological pathways with clinical significance. *World Journal of Gastroenterology*. Published online 2014. doi:10.3748/wjg.v20.i14.3719
424. Chow FCL, Chok KSH. Colorectal liver metastases: An update on multidisciplinary approach. *World Journal of Hepatology*. 2019;11(2):150-172. doi:10.4254/wjh.v11.i2.150
425. Tomlinson JS, Jarnagin WR, DeMatteo RP, Fong Y, Kornprat P, Gonen M, Kemeny N, Brennan MF, Blumgart LH, D'Angelica M. Actual 10-year survival after resection of colorectal liver metastases defines cure. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(29):4575-4580. doi:10.1200/JCO.2007.11.0833
426. Lintoiu-Ursut B, Tulin A, Constantinoiu S. Recurrence after hepatic resection in colorectal cancer liver metastasis -Review article-. *Journal of medicine and life*. 2015;8 Spec(Spec Issue):12-14.
427. Vibert E, Pittau G, Gelli M, Cunha AS, Jamot L, Faivre J, Castro Benitez C, Castaing D, Adam R. Actual incidence and long-term consequences of posthepatectomy liver failure after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Surgery*. 2014;155(1):94-105. doi:10.1016/j.surg.2013.05.039
428. Wee IJY, Syn N, Lee LS, Tan SS, Chiow AKH. A systematic review and meta-analysis on the quality of life after hepatic resection. *HPB*. Published online 2020. doi:10.1016/j.hpb.2019.11.016
429. Tinguely P, Dal G, Bottai M, Nilsson H, Freedman J, Engstrand J. Microwave ablation versus resection for colorectal cancer liver metastases – A propensity score analysis from a population-based nationwide registry. *European Journal of Surgical Oncology*.

Published online 2019. doi:10.1016/j.ejso.2019.12.002

430. No Title. <https://seer.cancer.gov/>
431. Väyrynen SA, Väyrynen JP, Klintrup K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Tuomisto A, Mäkinen MJ. Clinical impact and network of determinants of tumour necrosis in colorectal cancer. *British journal of cancer*. 2016;114(12):1334-1342. doi:10.1038/bjc.2016.128
432. Saraiva AL, Carneiro F. New Insights Into the Role of Tissue Eosinophils in the Progression of Colorectal Cancer: A Literature Review. *Acta Médica Portuguesa*. 2018;31(6):329. doi:10.20344/amp.10112
433. Jakubowska K, Kisielewski W, Kańczuga-Koda L, Koda M, Famulski W. Diagnostic value of inflammatory cell infiltrates, tumor stroma percentage and disease-free survival in patients with colorectal cancer. *Oncology letters*. 2017;14(3):3869-3877. doi:10.3892/ol.2017.6639
434. Tallerico R, Todaro M, Di Franco S, Maccalli C, Garofalo C, Sottile R, Palmieri C, Tirinato L, Pangigadde PN, La Rocca R, Mandelboim O, Stassi G, Di Fabrizio E, Parmiani G, Moretta A, Dieli F, Karre K, Carbone E. Human NK Cells Selective Targeting of Colon Cancer-Initiating Cells: A Role for Natural Cytotoxicity Receptors and MHC Class I Molecules. *The Journal of Immunology*. 2013;190(5):2381-2390. doi:10.4049/jimmunol.1201542
435. Coppola A, Arriga R, Lauro D, Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Palomba P, Venditti A, Sconocchia G. NK Cell Inflammation in the Clinical Outcome of Colorectal Carcinoma. *Frontiers in medicine*. 2015;2:33. doi:10.3389/fmed.2015.00033
436. Zhao H, Su W, Kang Q, Xing Z, Lin X, Wu Z. Natural killer cells inhibit oxaliplatin-resistant colorectal cancer by repressing WBCR22 via upregulating microRNA-146b-5p. *American journal of cancer research*. 2018;8(5):824-834. Accessed May 20, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29888105>
437. Li L, Li W, Wang C, Yan X, Wang Y, Niu C, Zhang X, Li M, Tian H, Yao C, Jin H, Han F, Xu D, Han W, Li D, Cui J. Adoptive transfer of natural killer cells in combination with chemotherapy improves outcomes of patients with locally advanced colon carcinoma. *Cytotherapy*. 2018;20(1):134-148. doi:10.1016/j.jcyt.2017.09.009
438. Cantero-Cid R, Casas-Martin J, Hernández-Jiménez E, Cubillos-Zapata C, Varela-Serrano A, Avendaño-Ortiz J, Casarrubios M, Montalbán-Hernández K, Villacañas-Gil I, Guerra-Pastrián L, Peinado B, Marcano C, Aguirre LA, López-Collazo E. PD-L1/PD-1 crosstalk in colorectal cancer: are we targeting the right cells? *BMC cancer*. 2018;18(1):945. doi:10.1186/s12885-018-4853-0
439. Marginean EC, Melosky B. Is There a Role for Programmed Death Ligand-1 Testing and Immunotherapy in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability? doi:10.5858/arpa.2017-0041-RA
440. Yi M, Jiao D, Xu H, Liu Q, Zhao W, Han X, Wu K. Biomarkers for predicting efficacy of PD-1/PD-L1 inhibitors. *Molecular cancer*. 2018;17(1):129. doi:10.1186/s12943-018-0864-3
441. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, Peters S. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Annals of Oncology*. 2019;30(1):44. doi:10.1093/ANNONC/MDY495
442. Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current treatment options in oncology*. 2015;16(7):30. doi:10.1007/s11864-015-0348-2

443. Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, Nuryadi E, Sekine R, Oike T, Kakoti S, Yoshimoto Y, Held KD, Suzuki Y, Kono K, Miyagawa K, Nakano T, Shibata A. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. *Nature Communications*. 2017;8(1):1751. doi:10.1038/s41467-017-01883-9
444. Dhawan P, Ahmad R, Srivastava AS, Singh AB. Cancer stem cells and colorectal cancer: an overview. *Current topics in medicinal chemistry*. 2011;11(13):1592-1598. Accessed May 20, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21446911>
445. Roy S. Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: Genetic and Epigenetic Changes. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. Published online 2013. doi:10.4172/2157-7633.S7-006
446. Langan RC, Mullinax JE, Raiji MT, Upham T, Summers T, Stojadinovic A, Avital I. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *Journal of Cancer*. Published online 2013. doi:10.7150/jca.5832
447. Fariña Sarasqueta A, Forte GI, Corver WE, de Miranda NF, Ruano D, van Eijk R, Oosting J, Tollenaar RA, van Wezel T, Morreau H. Integral analysis of p53 and its value as prognostic factor in sporadic colon cancer. *BMC Cancer*. 2013;13(1):277. doi:10.1186/1471-2407-13-277
448. Li X-L, Zhou J, Chen Z-R, Chng W-J. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(1):84-93. doi:10.3748/wjg.v21.i1.84
449. Vaughn CP, ZoBell SD, Furtado L V., Baker CL, Samowitz WS. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2011;50(5):307-312. doi:10.1002/gcc.20854
450. Porru M, Pompili L, Caruso C, Biroccio A, Leonetti C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2018;37(1):57. doi:10.1186/s13046-018-0719-1
451. Safaeian M, Robbins HA, Berndt SI, Lynch CF, Fraumeni JF, Engels EA, Engels E. Risk of Colorectal Cancer After Solid Organ Transplantation in the United States. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2016;16(3):960-967. doi:10.1111/ajt.13549
452. Mouchli MA, Singh S, Loftus E V., Boardman L, Talwalkar J, Rosen CB, Heimbach JK, Wiesner RH, Hasan B, Poterucha JJ, Kymberly WD. Risk Factors and Outcomes of De Novo Cancers (Excluding Nonmelanoma Skin Cancer) After Liver Transplantation for Primary Sclerosing Cholangitis. *Transplantation*. 2017;101(8):1859-1866. doi:10.1097/TP.0000000000001725
453. Merchea A, Abdelsattar ZM, Taner T, Dean PG, Colibaseanu DT, Larson DW, Dozois EJ. Outcomes of Colorectal Cancer Arising in Solid Organ Transplant Recipients. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2014;18(3):599-604. doi:10.1007/s11605-013-2402-3
454. Hall E, Segev D, Engels E. Racial/Ethnic Differences in Cancer Risk After Kidney Transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(3):714. doi:10.1111/AJT.12066
455. Kwon JH, Koh S-J, Kim JY, Kim JW, Lee KL, Kim BG, Im JP, Kim JS. Prevalence of Advanced Colorectal Neoplasm After Kidney Transplantation: Surveillance Based on the Results of

- Screening Colonoscopy. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015;60(6):1761-1769. doi:10.1007/s10620-015-3525-z
456. Lee JT, Dunn TB, Sirany A-M, Melton GB, Madoff RD, Kwaan MR. Colorectal Surgery After Kidney Transplantation: Characteristics of Early vs. Late Posttransplant Interventions. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2014;18(7):1299-1305. doi:10.1007/s11605-014-2534-0
457. Nishihori T, Strazzabosco M, Saif MW. Incidence and management of colorectal cancer in liver transplant recipients. *Clinical colorectal cancer*. 2008;7(4):260-266. doi:10.3816/CCC.2008.n.033
458. Saidi RF, Dudrick PS, Goldman MH. Colorectal cancer after renal transplantation. *Transplantation proceedings*. 2003;35(4):1410-1412. Accessed May 20, 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826174>
459. Adam R, Kitano Y. Multidisciplinary approach of liver metastases from colorectal cancer. *Annals of Gastroenterological Surgery*. 2019;3(1):50-56. doi:10.1002/ags3.12227
460. Xu F, Tang B, Jin TQ, Dai CL. Current status of surgical treatment of colorectal liver metastases. *World Journal of Clinical Cases*. 2018;6(14):716-734. doi:10.12998/wjcc.v6.i14.716
461. Lee JH, Lee SW. The Roles of Carcinoembryonic Antigen in Liver Metastasis and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology Research and Practice*. Published online 2017. doi:10.1155/2017/7521987
462. Govindarajan A, Paty PB. Predictive markers of colorectal cancer liver metastases. *Future oncology (London, England)*. 2011;7(2):299-307. doi:10.2217/fon.10.184
463. Passot G, Kim BJ, Glehen O, Mehran RJ, Kopetz SE, Goere D, Overman MJ, Pocard M, Marchal F, Conrad C, Aloia TA, Vauthey JN, Chun YS, Abba J, Abboud K, Alyami M, Arvieux C, Asnacios A, Averous G, Bakrin N, Bardier A, Rejeb H Ben, Bereder JM, Bernard JL, Bibeau F, Bonnefoy I, Borg C, Boschetti G, Bouarioua N, Bouche O, Bouzard D, Brigand C, Cacheux W, Capitain O, Carrère S, Carretier M, Castel B, Chauvenet M, Chevallier A, Coffin B, Costan C, Cotte E, Courvoisier T, Dahan L, Dartigues P, De Chaisemartin C, Dechelotte P, Deguelte-Lardière S, Delpero JR, Del Grande J, Demarchi M, Desandes E, Desolneux G, Dufour P, Dumont F, Durand-Fontanier S, Eveno C, Evrard S, Facy O, Farkhondeh F, Fontaine J, Gagniere J, Galais MP, Ghouti L, Gilly FN, Goasguen N, Gornet JM, Gourdiolle P, Guerin-Meyer V, Guilloit JM, Guimbaud R, Guyon F, Heyd B, Heymann MF, Isaac S, Jouet P, Jourdan-Enfer P, Jouve JL, Kaci R, Karoui M, Kianmanesh R, Kirzin S, Kurtz JE, Labrousse F, Lebrun-Ly V, Lefevre J, Lelong B, Lemaistre AE, Leroux-Broussier A, Levillain P, Linot B, Dico R Lo, Loi V, Lorimier G, Mahammat A, Malka D, Marchal F, Mariani A, et al. Impact of RAS Mutations in Metastatic Colorectal Cancer After Potentially Curative Resection: Does Site of Metastases Matter? *Annals of Surgical Oncology*. 2018;25(1):179-187. doi:10.1245/s10434-017-6141-7
464. Gregoire E, Hoti E, Gorden DL, Serna S De, Pascal G, Azoulay D. Utility or futility of prognostic scoring systems for colorectal liver metastases in an era of advanced multimodal therapy. *European Journal of Surgical Oncology*. 2010;36(6):568-574. doi:10.1016/j.ejso.2010.03.009
465. Adam R, De Gramont A, Figueras J, Guthrie A, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Tabernero J, Teh C, Van Cutsem E. The oncosurgery approach to managing liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *The oncologist*. 2012;17(10):1225-1239.

- doi:10.1634/theoncologist.2012-0121
466. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two-stage hepatectomy: A planned strategy to treat irresectable liver tumors. *Annals of surgery*. 2000;232(6):777-785.
 467. Schadde E, Ardiles V, Slankamenac K, Tschuor C, Sergeant G, Amacker N, Baumgart J, Croome K, Hernandez-Alejandro R, Lang H, de Santibañes E, Clavien P-A. ALPPS Offers a Better Chance of Complete Resection in Patients with Primarily Unresectable Liver Tumors Compared with Conventional-Staged Hepatectomies: Results of a Multicenter Analysis. *World Journal of Surgery*. 2014;38(6):1510-1519. doi:10.1007/s00268-014-2513-3
 468. Viganò L, Procopio F, Cimino MM, Donadon M, Gatti A, Costa G, Del Fabbro D, Torzilli G. Is Tumor Detachment from Vascular Structures Equivalent to R0 Resection in Surgery for Colorectal Liver Metastases? An Observational Cohort. *Annals of Surgical Oncology*. 2016;23(4):1352-1360. doi:10.1245/s10434-015-5009-y
 469. Imai K, Allard MA, Castro Benitez C, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Castaing D, Baba H, Adam R. Long-term outcomes of radiofrequency ablation combined with hepatectomy compared with hepatectomy alone for colorectal liver metastases. *British Journal of Surgery*. 2017;104(5):570-579. doi:10.1002/bjs.10447
 470. Dueland S, Syversveen T, Solheim JM, Solberg S, Grut H, Bjørnbeth BA, Hagness M, Line PD. Survival following liver transplantation for patients with nonresectable liver-only colorectal metastases. *Annals of Surgery*. 2020;271(2):212-218. doi:10.1097/SLA.0000000000003404
 471. de Santibañes E, Clavien P-A. Playing Play-Doh to Prevent Postoperative Liver Failure. *Annals of Surgery*. 2012;255(3):415-417. doi:10.1097/SLA.0b013e318248577d
 472. Guiu B, Chevallier P, Denys A, Delhom E, Pierredon-Foulongne M-A, Rouanet P, Fabre J-M, Quenet F, Herrero A, Panaro F, Baudin G, Ramos J. Simultaneous trans-hepatic portal and hepatic vein embolization before major hepatectomy: the liver venous deprivation technique. *European Radiology*. 2016;26(12):4259-4267. doi:10.1007/s00330-016-4291-9
 473. Hamady ZZR, Lodge JPA, Welsh FK, Toogood GJ, White A, John T, Rees M. One-millimeter cancer-free margin is curative for colorectal liver metastases: A propensity score case-match approach. *Annals of Surgery*. 2014;259(3):543-548. doi:10.1097/SLA.0b013e3182902b6e
 474. Torzilli G, Serenari M, Viganò L, Cimino M, Benini C, Massani M, Ettore GM, Cescon M, Ferrero A, Cillo U, Aldrighetti L, Jovine E. Outcomes of enhanced one-stage ultrasound-guided hepatectomy for bilobar colorectal liver metastases compared to those of ALPPS: a multicenter case-match analysis. *HPB*. 2019;21(10):1411-1418. doi:10.1016/j.hpb.2019.04.001
 475. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, Sasaki K, Ijzermans JNM, Van Vugt JLA, Pawlik TM, Choti MA, Cameron JL, He J, Wolfgang CL, Weiss MJ. Anatomical Resections Improve Disease-free Survival in Patients with KRAS -mutated Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgery*. 2017;266(4):641-649. doi:10.1097/SLA.0000000000002367
 476. Procopio F, Viganò L, Cimino M, Donadon M, Del Fabbro D, Torzilli G. Does KRAS mutation status impact the risk of local recurrence after R1 vascular resection for colorectal liver metastasis? An observational cohort study. *European Journal of Surgical Oncology*. Published online 2019. doi:10.1016/j.ejso.2019.12.004

477. Oliveira RC, Alexandrino H, Cipriano MA, Tralhão JG. Liver metastases and histological growth patterns: Biological behavior and potential clinical implications-another path to individualized medicine? *Journal of Oncology*. Published online 2019. doi:10.1155/2019/6280347
478. van Dam P-J, van der Stok EP, Teuwen L-A, Van den Eynden GG, Illemann M, Frentzas S, Majeed AW, Eefsen RL, Coebergh van den Braak RRJ, Lazaris A, Fernandez MC, Galjart B, Laerum OD, Rayes R, Grünhagen DJ, Van de paer M, Sucaet Y, Mudhar HS, Schvimer M, Nyström H, Kockx M, Bird NC, Vidal-Vanaclocha F, Metrakos P, Simoneau E, Verhoef C, Dirix LY, Van Laere S, Gao Z, Brodt P, Reynolds AR, Vermeulen PB. International consensus guidelines for scoring the histopathological growth patterns of liver metastasis. *British Journal of Cancer*. 2017;117(10):1427-1441. doi:10.1038/bjc.2017.334
479. Fernández Moro C, Bozóky B, Gerling M. Growth patterns of colorectal cancer liver metastases and their impact on prognosis: a systematic review. *BMJ open gastroenterology*. 2018;5(1):e000217. doi:10.1136/bmjgast-2018-000217
480. Galjart B, Nierop PMH, van der Stok EP, van den Braak RRJC, Höppener DJ, Daelemans S, Dirix LY, Verhoef C, Vermeulen PB, Grünhagen DJ. Angiogenic desmoplastic histopathological growth pattern as a prognostic marker of good outcome in patients with colorectal liver metastases. *Angiogenesis*. Published online 2019. doi:10.1007/s10456-019-09661-5
481. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Collette L, Praet M, Bethe U, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 2008;371(9617):1007-1016. doi:10.1016/S0140-6736(08)60455-9
482. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Mauer M, Tanis E, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): Long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(12):1208-1215. doi:10.1016/S1470-2045(13)70447-9
483. Zhu D, Zhong Y, Wei Y, Ye L, Lin Q, Ren L, Ye Q, Liu T, Xu J, Qin X. Effect of neoadjuvant chemotherapy in patients with resectable colorectal liver metastases. *PLoS ONE*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0086543
484. Bhogal RH, Hodson J, Bramhall SR, Isaac J, Marudanayagam R, Mirza DF, Muiesan P, Sutcliffe RP. Predictors of early recurrence after resection of colorectal liver metastases. *World Journal of Surgical Oncology*. 2015;13(1). doi:10.1186/s12957-015-0549-y
485. Spelt L, Andersson B, Nilsson J, Andersson R. Prognostic models for outcome following liver resection for colorectal cancer metastases: A systematic review. *European Journal of Surgical Oncology*. 2012;38(1):16-24. doi:10.1016/j.ejso.2011.10.013
486. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: Analysis of 1001 consecutive cases. In: *Annals of Surgery*. Vol 230. ; 1999:309-321. doi:10.1097/00000658-199909000-00004
487. Acciuffi S, Meyer F, Bauschke A, Settmacher U, Lippert H, Croner R, Altendorf-Hofmann A. Analysis of prognostic factors after resection of solitary liver metastasis in colorectal

- cancer: a 22-year bicentre study. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2018;144(3):593-599. doi:10.1007/s00432-018-2583-y
488. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D. Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver: A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Cancer*. 1996;77(7):1254-1262. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1254::AID-CNCR5>3.0.CO;2-I
489. Kerkar SP, Kemp CD, Avital I. Liver resections in metastatic gastric cancer. *HPB*. 2010;12(9):589-596. doi:10.1111/j.1477-2574.2010.00224.x
490. Markar SR, Mikhail S, Malietzis G, Athanasiou T, Mariette C, Sasako M, Hanna GB. Influence of surgical resection of hepatic metastases from gastric adenocarcinoma on long-term survival: Systematic review and pooled analysis. *Annals of Surgery*. 2016;263(6):1092-1101. doi:10.1097/SLA.0000000000001542
491. Montagnani F, Crivelli F, Aprile G, Vivaldi C, Pecora I, De Vivo R, Clerico MA, Fornaro L. Long-term survival after liver metastasectomy in gastric cancer: Systematic review and meta-analysis of prognostic factors. *Cancer Treatment Reviews*. 2018;69:11-20. doi:10.1016/j.ctrv.2018.05.010
492. Liao YY, Peng NF, Long D, Yu PC, Zhang S, Zhong JH, Li LQ. Hepatectomy for liver metastases from gastric cancer: a systematic review. *BMC Surgery*. 2017;17(1). doi:10.1186/s12893-017-0215-0
493. Sano K, Yamamoto M, Mimura T, Endo I, Nakamori S, Konishi M, Miyazaki M, Wakai T, Nagino M, Kubota K, Unno M, Sata N, Yamamoto J, Yamaue H, Takada T. Outcomes of 1,639 hepatectomies for non-colorectal non-neuroendocrine liver metastases: a multicenter analysis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2018;25(11):465-475. doi:10.1002/jhbp.587
494. Ministrini S, Solaini L, Cipollari C, Sofia S, Marino E, D'Ignazio A, Bencivenga M, Tiberio GAM. Surgical treatment of hepatic metastases from gastric cancer. *Updates in Surgery*. 2018;70(2):273-278. doi:10.1007/s13304-018-0536-2
495. Hwang SE, Yang DH, Kim CY. Prognostic factors for survival in patients with hepatic recurrence after curative resection of gastric cancer. *World Journal of Surgery*. 2009;33(7):1468-1472. doi:10.1007/s00268-009-0034-2
496. Garancini M, Uggeri F, Degrate L, Nespoli L, Gianotti L, Nespoli A, Uggeri F, Romano F. Surgical treatment of liver metastases of gastric cancer: Is local treatment in a systemic disease worthwhile? *HPB*. 2012;14(3):209-215. doi:10.1111/j.1477-2574.2011.00428.x
497. Kinoshita T, Kinoshita T, Saiura A, Esaki M, Sakamoto H, Yamanaka T. Multicentre analysis of long-term outcome after surgical resection for gastric cancer liver metastases. *British Journal of Surgery*. 2015;102(1):102-107. doi:10.1002/bjs.9684
498. Ohkura Y, Shinohara H, Haruta S, Ueno M, Hashimoto M, Sakai Y, Udagawa H. Hepatectomy Offers Superior Survival Compared with Non-surgical Treatment for ≤3 Metastatic Tumors with Diameters < 3 cm from Gastric Cancer: A Retrospective Study. *World Journal of Surgery*. 2015;39(11):2757-2763. doi:10.1007/s00268-015-3151-0
499. Ito H, Are C, Gonen M, D'Angelica M, DeMatteo RP, Kemeny NE, Fong Y, Blumgart LH, Jarnagin WR. Effect of postoperative morbidity on long-term survival after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Annals of Surgery*. 2008;247(6):994-1002. doi:10.1097/SLA.0b013e31816c405f

500. Vibert E, Pittau G, Gelli M, Cunha AS, Jamot L, Faivre J, Benitez CC, Castaing D, Adam R. Actual incidence and long-term consequences of posthepatectomy liver failure after hepatectomy for colorectal liver metastases. *Surgery (United States)*. 2014;155(1):94-105. doi:10.1016/j.surg.2013.05.039
501. Correa-Gallego C, Gonen M, Fischer M, Grant F, Kemeny NE, Arslan-Carlon V, Kingham TP, DeMatteo RP, Fong Y, Allen PJ, D'Angelica MI, Jarnagin WR. Perioperative complications influence recurrence and survival after resection of hepatic colorectal metastases. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;20(8):2477-2484. doi:10.1245/s10434-013-2975-9
502. Tatsubayashi T, Tanizawa Y, Miki Y, Tokunaga M, Bando E, Kawamura T, Sugiura T, Kinugasa Y, Uesaka K, Terashima M. Treatment outcomes of hepatectomy for liver metastases of gastric cancer diagnosed using contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Gastric Cancer*. 2017;20(2):387-393. doi:10.1007/s10120-016-0611-7
503. Holdhoff M, Schmidt K, Diehl F, Aggrawal N, Angenendt P, Romans K, Edelstein DL, Torbenson M, Kinzler KW, Vogelstein B, Choti MA, Diaz LA. Detection of tumor DNA at the margins of colorectal cancer liver metastasis. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(11):3551-3557. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3087
504. Are C, Gonen M, Zazzali K, DeMatteo RP, Jarnagin WR, Fong Y, Blumgart LH, D'Angelica M. The impact of margins on outcome after hepatic resection for colorectal metastasis. *Annals of Surgery*. 2007;246(2):295-300. doi:10.1097/SLA.0b013e31811ea962
505. Tranchart H, Chirica M, Faron M, Ballardur P, Lefevre LB, Svrcek M, De Gramont A, Tiret E, Paye F. Prognostic impact of positive surgical margins after resection of colorectal cancer liver metastases: Reappraisal in the era of modern chemotherapy. *World Journal of Surgery*. 2013;37(11):2647-2654. doi:10.1007/s00268-013-2186-3
506. Poultides GA, Schulick RD, Pawlik TM. Hepatic resection for colorectal metastases: The impact of surgical margin status on outcome. *HPB*. 2010;12(1):43-49. doi:10.1111/j.1477-2574.2009.00121.x
507. Serrablo A, Paliogiannis P, Pulighe F, Moro SSM, Borrego-Estella V, Attene F, Scognamillo F, Hörndler C. Impact of novel histopathological factors on the outcomes of liver surgery for colorectal cancer metastases. *European Journal of Surgical Oncology*. 2016;42(9):1268-1277. doi:10.1016/j.ejso.2016.02.013
508. Margonis GA, Sasaki K, Kim Y, Samaha M, Buettner S, Amini N, Antoniou E, Pawlik TM. Tumor Biology Rather Than Surgical Technique Dictates Prognosis in Colorectal Cancer Liver Metastases. *Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2016;20(11):1821-1829. doi:10.1007/s11605-016-3198-8
509. Brouquet A, Zimmitti G, Kopetz S, Stift J, Julié C, Lemaistre AI, Agarwal A, Patel V, Benoist S, Nordlinger B, Gandini A, Rivoire M, Stremitzer S, Gruenberger T, Vauthey JN, Maru DM. Multicenter validation study of pathologic response and tumor thickness at the tumor-normal liver interface as independent predictors of disease-free survival after preoperative chemotherapy and surgery for colorectal liver metastases. *Cancer*. 2013;119(15):2778-2788. doi:10.1002/cncr.28097
510. Folprecht G, Grothey A, Alberts S, Raab H-R, Köhne C-H. Neoadjuvant treatment of unresectable colorectal liver metastases: correlation between tumour response and resection rates. *Annals of Oncology*. 2005;16(8):1311-1319. doi:10.1093/annonc/mdi246
511. Eefsen RL, Vermeulen PB, Christensen IJ, Laerum OD, Mogensen MB, Rolff HC, Van den

- Eynden GG, Høyer-Hansen G, Osterlind K, Vainer B, Illemann M. Growth pattern of colorectal liver metastasis as a marker of recurrence risk. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2015;32(4):369-381. doi:10.1007/s10585-015-9715-4
512. Rajaganeshan R, Prasad R, Guillou PJ, Chalmers CR, Scott N, Sarkar R, Poston G, Jayne DG. The influence of invasive growth pattern and microvessel density on prognosis in colorectal cancer and colorectal liver metastases. *British Journal of Cancer*. 2007;96(7):1112-1117. doi:10.1038/sj.bjc.6603677
513. Stessels F, Van den Eynden G, Van Der Auwera I, Salgado R, Van Den Heuvel E, Harris AL, Jackson DG, Colpaert CG, Van Marck EA, Dirix LY, Vermeulen PB. Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia. *British Journal of Cancer*. 2004;90(7):1429-1436. doi:10.1038/sj.bjc.6601727
514. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *American Journal of Pathology*. 2007;170(1):1-15. doi:10.2353/ajpath.2007.060302
515. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological Reviews*. 2004;56(4):549-580. doi:10.1124/pr.56.4.3
516. Nierop PMH, van der Stok EP, Groot Koerkamp B, Allen PJ, Jarnagin WR, Kemeny NE, Kingham TP, Grünhagen DJ, Verhoef C, D'Angelica MI. Histopathological growth patterns and positive margins after resection of colorectal liver metastases. *HPB*. 2018;20:S223-S224. doi:10.1016/j.hpb.2018.06.114
517. Nierop PMH, Galjart B, Höppener DJ, van der Stok EP, Coebergh van den Braak RRJ, Vermeulen PB, Grünhagen DJ, Verhoef C. Salvage treatment for recurrences after first resection of colorectal liver metastases: the impact of histopathological growth patterns. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2019;36(2):109-118. doi:10.1007/s10585-019-09960-7
518. Aloia TA, Zimmitti G, Conrad C, Gottumukalla V, Kopetz S, Vauthey J-N. Return to intended oncologic treatment (RIOT): A novel metric for evaluating the quality of oncosurgical therapy for malignancy. *Journal of Surgical Oncology*. 2014;110(2):107-114. doi:10.1002/jso.23626
519. Line P-D, Hagness M, Dueland S. The Potential Role of Liver Transplantation as a Treatment Option in Colorectal Liver Metastases. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/8547940
520. Simoneau E, D'Angelica M, Halazun KJ. Liver transplantation for colorectal liver metastasis. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2019;24(2):175-181. doi:10.1097/MOT.0000000000000623
521. Andres A, Oldani G, Berney T, Compagnon P, Line PD, Toso C. Transplantation for colorectal metastases: On the edge of a revolution. *Translational Gastroenterology and Hepatology*. 2018;3(September). doi:10.21037/tgh.2018.08.04
522. Eefsen RL, Van den Eynden GG, Brodt P, Burnier J V., Hoyer-Hansen G, Christensen IJ, Metrakos P, Laerum OD, Federspiel B, Willemoes G, Osterlind K, Illemann M. Growth patterns of liver metastases as compared to resected tumors of the same colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. Published online 2012. doi:10.1200/jco.2012.30.4_suppl.519

523. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A, Marincola FM, Mozzillo N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):85. doi:10.1186/1479-5876-10-85
524. Mehrgou A, Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*. 2016;30(1):369.
525. Schwarz RE, Berlin JD, Lenz HJ, Nordlinger B, Rubbia-Brandt L, Choti MA. Systemic cytotoxic and biological therapies of colorectal liver metastases: Expert consensus statement. *HPB*. 2013;15(2):106-115. doi:10.1111/j.1477-2574.2012.00558.x
526. Lazaris A, Amri A, Petrillo SK, Zoroquiain P, Ibrahim N, Salman A, Gao ZH, Vermeulen PB, Metrakos P. Vascularization of colorectal carcinoma liver metastasis: insight into stratification of patients for anti-angiogenic therapies. *Journal of Pathology: Clinical Research*. Published online 2018. doi:10.1002/cjp2.100
527. Kuczynski EA, Yin M, Bar-Zion A, Lee CR, Butz H, Man S, Daley F, Vermeulen PB, Yousef GM, Foster FS, Reynolds AR, Kerbel RS. Co-option of liver vessels and not sprouting angiogenesis drives acquired sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. Published online 2016. doi:10.1093/jnci/djw030
528. Wu JB, Sarmiento AL, Fiset PO, Lazaris A, Metrakos P, Petrillo S, Gao ZH. Histologic features and genomic alterations of primary colorectal adenocarcinoma predict growth patterns of liver metastasis. *World Journal of Gastroenterology*. 2019;25(26):3408-3425. doi:10.3748/wjg.v25.i26.3408
529. Wang Q, Shi YL, Zhou K, Wang LL, Yan ZX, Liu YL, Xu LL, Zhao SW, Chu HL, Shi TT, Ma QH, Bi J. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer. *Cell Death and Disease*. 2018;9(7):1-11. doi:10.1038/s41419-018-0776-6
530. Vasan N, Toska E, Scaltriti M. Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. Published online 2019. doi:10.1093/annonc/mdz281
531. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, Le Tourneau C, Sablin MP, Lacroix L, Enrico D, Miran I, Jovelet C, Bièche I, Soria JC, Bertucci F, Bonnefoi H, Campone M, Dalenc F, Bachelot T, Jacquet A, Jimenez M, André F. Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020;31(3):377-386. doi:10.1016/j.annonc.2019.11.006
532. Brandão M, Caparica R, Eiger D, de Azambuja E. Biomarkers of response and resistance to PI3K inhibitors in estrogen receptor-positive breast cancer patients and combination therapies involving PI3K inhibitors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. Published online 2019. doi:10.1093/annonc/mdz280
533. Gonciar D, Mocan T, Matea CT, Zdrehus C, Mosteanu O, Mocan L, Pop T. Nanotechnology in metastatic cancer treatment: Current achievements and future research trends. *Journal of Cancer*. 2019;10(6):1358-1369. doi:10.7150/jca.28394
534. Zhao CY, Cheng R, Yang Z, Tian ZM. Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy. *Molecules*. 2018;23(4). doi:10.3390/molecules23040826
535. Arshad U, Sutton PA, Ashford MB, Treacher KE, Liptrott NJ, Rannard SP, Goldring CE, Owen A. Critical considerations for targeting colorectal liver metastases with nanotechnology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*.

Published online 2020. doi:10.1002/wnan.1588

536. Okholm C, Mollerup TK, Schultz NA, Strandby RB, Achiam MP. Synchronous and metachronous liver metastases in patients with colorectal cancer. *Danish Medical Journal*. 2018;65(12).
537. Keum MA, Lim SB, Kim SA, Yoon YS, Kim CW, Yu CS, Kim JC. Clinicopathologic factors affecting recurrence after curative surgery for stage I colorectal cancer. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*. 2012;28(1):49-55. doi:10.3393/jksc.2012.28.1.49
538. Akishima-Fukasawa Y, Ishikawa Y, Akasaka Y, Uzuki M, Inomata N, Yokoo T, Ishii R, Shimokawa R, Mukai K, Kiguchi H, Suzuki K, Fujiwara M, Ogata K, Niino H, Sugiura H, Ichinose A, Kuroda Y, Kuroda D, Ishii T. Histopathological predictors of regional lymph node metastasis at the invasive front in early colorectal cancer. *Histopathology*. 2011;59(3):470-481. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.03964.x
539. Kajiwaru Y, Ueno H, Hashiguchi Y, Mochizuki H, Hase K. Risk factors of nodal involvement in T2 colorectal cancer. *Diseases of the Colon and Rectum*. 2010;53(10):1393-1399. doi:10.1007/DCR.0b013e3181ec5f66
540. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *American Journal of Surgical Pathology*. 2009;33(1):134-141. doi:10.1097/PAS.0b013e318184cd55
541. Egashira Y, Yoshida T, Hirata I, Hamamoto N, Akutagawa H, Takeshita A, Noda N, Kurisu Y, Shibayama Y. Analysis of pathological risk factors for lymph node metastasis of submucosal invasive colon cancer. *Modern Pathology*. 2004;17(5):503-511. doi:10.1038/modpathol.3800030
542. Enderling H, Hlatky L, Hahnfeldt P. Tumor morphological evolution: Directed migration and gain and loss of the self-metastatic phenotype. *Biology Direct*. 2010;5:23. doi:10.1186/1745-6150-5-23
543. Shindoh J, Loyer EM, Kopetz S, Boonsirikamchai P, Maru DM, Chun YS, Zimmiti G, Curley SA, Charnsangavej C, Aloia TA, Vauthey J-N. Optimal Morphologic Response to Preoperative Chemotherapy: An Alternate Outcome End Point Before Resection of Hepatic Colorectal Metastases. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(36):4566-4572. doi:10.1200/JCO.2012.45.2854
544. Chun YS, Vauthey JN, Boonsirikamchai P, Maru DM, Kopetz S, Palavecino M, Curley SA, Abdalla EK, Kaur H, Charnsangavej C, Loyer EM. Association of computed tomography morphologic criteria with pathologic response and survival in patients treated with bevacizumab for colorectal liver metastases. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2009;302(21):2338-2344. doi:10.1001/jama.2009.1755
545. Cheng J, Wei J, Tong T, Sheng W, Zhang Y, Han Y, Gu D, Hong N, Ye Y, Tian J, Wang Y. Prediction of Histopathologic Growth Patterns of Colorectal Liver Metastases with a Noninvasive Imaging Method. *Annals of Surgical Oncology*. Published online 2019. doi:10.1245/s10434-019-07910-x
546. Choi SH, Kim SY, Park SH, Kim KW, Lee JY, Lee SS, Lee MG. Diagnostic performance of CT, gadoxetate disodium-enhanced MRI, and PET/CT for the diagnosis of colorectal liver metastasis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2018;47(5):1237-1250. doi:10.1002/jmri.25852

547. Shin N-Y, Kim M-J, Lim JS, Park M-S, Chung Y-E, Choi J-Y, Kim KW, Park Y-N. Accuracy of gadoxetic acid-enhanced magnetic resonance imaging for the diagnosis of sinusoidal obstruction syndrome in patients with chemotherapy-treated colorectal liver metastases. *European radiology*. 2012;22(4):864-871. doi:10.1007/s00330-011-2333-x
548. Duque M, Alexandrino H, Donato H, Santos E, Ferreira L, Serôdio M, Donato P, Castro e Sousa F, Caseiro Alves F, Tralhão JG. Early functional response after portal vein embolization – difference between future liver remnant and embolized liver relative enhancement as a marker of improved hepatocellular reserve. *HPB*. 2018;20:S413-S414. doi:10.1016/J.HPB.2018.06.2753
549. Falcão D, Alexandrino H, Caetano Oliveira R, Martins J, Ferreira L, Martins R, Serôdio M, Martins M, Tralhão JG, Cipriano MA, Castro e Sousa F. Histopathologic patterns as markers of prognosis in patients undergoing hepatectomy for colorectal cancer liver metastases – Pushing growth as an independent risk factor for decreased survival. *European Journal of Surgical Oncology*. Published online 2018. doi:10.1016/j.ejso.2018.03.023
550. Adam R, Pascal G, Azoulay D, Tanaka K, Castaing D, Bismuth H, Clavien PA, Jaeck D, Bismuth H. Liver Resection for Colorectal Metastases: The Third Hepatectomy. In: *Annals of Surgery*. Vol 238. Lippincott Williams and Wilkins; 2003:871-884. doi:10.1097/01.sla.0000098112.04758.4e
551. Regimbeau JM, Cosse C, Kaiser G, Hubert C, Laurent C, Lapointe R, Isoniemi H, Adam R. Feasibility, safety and efficacy of two-stage hepatectomy for bilobar liver metastases of colorectal cancer: a LiverMetSurvey analysis. *HPB*. 2017;19(5):396-405. doi:10.1016/j.hpb.2017.01.008
552. Adam R, Yi B, Innominato PF, Barroso E, Laurent C, Giuliani F, Capussotti L, Lapointe R, Regimbeau JM, Lopez-Ben S, Isoniemi H, Hubert C, Lin JK, Gruenberger T, Elias D, Skipenko OG, Guglielmi A. Resection of colorectal liver metastases after second-line chemotherapy: is it worthwhile? A LiverMetSurvey analysis of 6415 patients. *European Journal of Cancer*. 2017;78:7-15. doi:10.1016/j.ejca.2017.03.009
553. Mainenti PP. Non-invasive diagnostic imaging of colorectal liver metastases. *World Journal of Radiology*. 2015;7(7):157. doi:10.4329/wjr.v7.i7.157
554. Behbahani S, Hoffmann JC, Stonebridge R, Mahboob S. Clinical case report: Sclerosing hemangioma of the liver, a rare but great mimicker. *Radiology Case Reports*. 2016;11(2):58-61. doi:10.1016/j.radcr.2016.02.015
555. Knijn N, Mekenkamp LJM, Klomp M, Vink-Börger ME, Tol J, Teerenstra S, Meijer JWR, Tebar M, Riemersma S, Van Krieken JHJM, Punt CJA, Nagtegaal ID. KRAS mutation analysis: A comparison between primary tumours and matched liver metastases in 305 colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*. 2011;104(6):1020-1026. doi:10.1038/bjc.2011.26
556. Mahmood N, Mihalciou C, Rabbani SA. Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): Diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Frontiers in Oncology*. 2018;8(FEB):24. doi:10.3389/fonc.2018.00024
557. Di Mauro C, Pesapane A, Formisano L, Rosa R, D'Amato V, Ciciola P, Servetto A, Marciano R, Orsini RC, Monteleone F, Zambrano N, Fontanini G, Servadio A, Pignataro G, Grumetto L, Lavecchia A, Bruzzese D, Iaccarino A, Troncone G, Veneziani BM, Montuori N, De Placido S, Bianco R. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression

- enhances invasion and metastasis in RAS mutated tumors. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-12. doi:10.1038/s41598-017-10062-1
558. van Dam PJ, Daelemans S, Ross E, Waumans Y, Van Laere S, Latacz E, Van Steen R, De Pooter C, Kockx M, Dirix L, Vermeulen PB. Histopathological growth patterns as a candidate biomarker for immunomodulatory therapy. *Seminars in Cancer Biology*. Published online 2018. doi:10.1016/j.semcan.2018.01.009
559. Ge Y, Westphalen CB, Ma WW, Vega KJ, Weygant N. Implications for tumor microenvironment and epithelial crosstalk in the management of gastrointestinal cancers. *Journal of Oncology*. Published online 2019. doi:10.1155/2019/4835318
560. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, Squadrito ML, Segura I, Li X, Knevels E, Costa S, Vinckier S, Dresselaer T, Åkerud P, De Mol M, Salomäki H, Phillipson M, Wyns S, Larsson E, Buyschaert I, Botling J, Himmelreich U, Van Ginderachter JA, De Palma M, Dewerchin M, Claesson-Welsh L, Carmeliet P. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell*. 2011;19(1):31-44. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.009
561. Bazzichetto C, Conciatori F, Falcone I, Cognetti F, Milella M, Ciuffreda L, Weygant N. Advances in Tumor-Stroma Interactions: Emerging Role of Cytokine Network in Colorectal and Pancreatic Cancer. *Journal of Oncology*. Published online 2019. doi:10.1155/2019/5373580
562. Ibrahim NS, Lazaris A, Rada M, Petrillo SK, Huck L, Hussain S, Ouladan S, Gao ZH, Gregorieff A, Essalmani R, Seidah NG, Metrakos P. Angiopoietin1 deficiency in hepatocytes affects the growth of colorectal cancer liver metastases (Crclm). *Cancers*. 2020;12(1). doi:10.3390/cancers12010035
563. Stremitzer S, Vermeulen P, Graver S, Kockx M, Dirix L, Yang D, Zhang W, Stift J, Wrba F, Gruenberger T, Lenz H-J, Scherer SJ. Immune phenotype and histopathological growth pattern in patients with colorectal liver metastases. *British Journal of Cancer*. Published online March 24, 2020:1-7. doi:10.1038/s41416-020-0812-z
564. Ganji PN, Park W, Wen J, Mahaseth H, Landry J, Farris AB, Willingham F, Sullivan PS, Proia DA, El-Hariry I, Taliaferro-Smith L, Diaz R, El-Rayes BF. Antiangiogenic effects of ganetespib in colorectal cancer mediated through inhibition of HIF-1 α and STAT-3. *Angiogenesis*. 2013;16(4):903-917. doi:10.1007/s10456-013-9364-7
565. Ioannou M, Paraskeva E, Baxevanidou K, Simos G, Papamichali R, Papacharalambous C, Samara M, Koukoulis G. HIF-1 α in colorectal carcinoma: Review of the literature. *Journal of BUON*. 2015;20(3):680-689.
566. McIntyre A, Patiar S, Wigfield S, Li JL, Ledaki I, Turley H, Leek R, Snell C, Gatter K, Sly WS, Vaughan-Jones RD, Swietach P, Harris AL. Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(11):3100-3111. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1877
567. Van Kuijk SJA, Yaromina A, Houben R, Niemans R, Lambin P, Dubois LJ. Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression in cancer patients: A meta-analysis. *Frontiers in Oncology*. 2016;6(MAR). doi:10.3389/fonc.2016.00069
568. Takayama Y, Suzuki K, Muto Y, Ichida K, Fukui T, Kakizawa N, Ishikawa H, Watanabe F, Hasegawa F, Saito M, Tsujinaka S, Futsuhara K, Miyakura Y, Noda H, Konishi F, Rikiyama T. Monitoring circulating tumor DNA revealed dynamic changes in KRAS status in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9(36):24398.

- doi:10.18632/oncotarget.25309
569. Li J, Yuan Y, Yang F, Wang Y, Zhu X, Wang Z, Zheng S, Wan D, He J, Wang J, Ba Y, Bai C, Bai L, Bai W, Bi F, Cai K, Cai M, Cai S, Chen G, Chen K, Chen L, Chen P, Chi P, Dai G, Deng Y, Ding K, Fan Q, Fang W, Fang X, Feng F, Fu C, Fu Q, Gu Y, He Y, Jia B, Jiang K, Lai M, Lan P, Li E, Li D, Li J, Li L, Li M, Li S, Li Y, Li Y, Li Z, Liang X, Liang Z, Lin F, Lin G, Liu H, Liu J, Liu T, Liu Y, Pan H, Pan Z, Pei H, Qiu M, Qu X, Ren L, Shen Z, Sheng W, Song C, Song L, Sun J, Sun L, Sun Y, Tang Y, Tao M, Wang C, Wang H, Wang J, Wang S, Wang X, Wang X, Wang Z, Wu A, Wu N, Xia L, Xiao Y, Xing B, Xiong B, Xu J, Xu J, Xu N, Xu R, Xu Z, Yang Y, Yao H, Ye Y, Yu Y, Yu Y, Yue J, Zhang J, Zhang J, Zhang S, Zhang W, et al. Expert consensus on multidisciplinary therapy of colorectal cancer with lung metastases (2019 edition). *Journal of Hematology and Oncology*. 2019;12(1):16. doi:10.1186/s13045-019-0702-0
 570. Welter S, Arfanis E, Christoph D, Hager T, Roesel C, Aigner C, Weinreich G, Theegarten D. Growth patterns of pulmonary metastases: Should we adjust resection techniques to primary histology and size? *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. Published online 2017. doi:10.1093/ejcts/ezx063
 571. Yeong SJ, Pak MG, Lee HW, Ha SY, Roh MS. Prognostic utility of histological growth patterns of colorectal lung oligometastasis. *Journal of Pathology and Translational Medicine*. Published online 2018. doi:10.4132/jptm.2017.12.27
 572. Ostrom QT, Wright CH, Barnholtz-Sloan JS. Brain metastases: epidemiology. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol 149. Elsevier B.V.; 2018:27-42. doi:10.1016/B978-0-12-811161-1.00002-5
 573. Imaizumi J, Shida D, Narita Y, Miyakita Y, Tanabe T, Takashima A, Boku N, Igaki H, Itami J, Kanemitsu Y. Prognostic factors of brain metastases from colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):755. doi:10.1186/s12885-019-5973-x
 574. Christensen TD, Spindler KLG, Palshof JA, Nielsen DL. Systematic review: Brain metastases from colorectal cancer-Incidence and patient characteristics. *BMC Cancer*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12885-016-2290-5
 575. Berghoff AS, Rajky O, Winkler F, Bartsch R, Furtner J, Hainfellner JA, Goodman SL, Weller M, Schittenhelm J, Preusser M. Invasion patterns in brain metastases of solid cancers. *Neuro-Oncology*. Published online 2013. doi:10.1093/neuonc/not112
 576. Fink K, Fink J. Imaging of brain metastases. *Surgical Neurology International*. 2013;4(SUPPL4):S209. doi:10.4103/2152-7806.111298
 577. Zhang J, Lam LKT. Colonoscopic colostomy model in rats for colon tumorigenesis studies. *Carcinogenesis*. 1994;15(8):1571-1576. doi:10.1093/carcin/15.8.1571
 578. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(4):239-252. doi:10.1038/nri3174
 579. Jin H, Liu X, Li VKM, Ding Y, Yun S, Liu F, Zhou S, Song Y, Ni M. A simple colostomy implantation model for evaluating colon cancer. *International journal of colorectal disease*. 2009;24(1):41-47. doi:10.1007/s00384-008-0569-y
 580. Donigan M, Norcross LS, Aversa J, Colon J, Smith J, Madero-Visbal R, Li S, McCollum N, Ferrara A, Gallagher JT, Baker CH. Novel murine model for colon cancer: non-operative trans-anal rectal injection. *The Journal of surgical research*. 2009;154(2):299-303. doi:10.1016/j.jss.2008.05.028

581. Zigmund E, Halpern Z, Elinav E, Brazowski E, Jung S, Varol C. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer. *PloS one*. 2011;6(12):e28858. doi:10.1371/journal.pone.0028858
582. Céspedes M V, Casanova I, Parreño M, Mangues R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clinical & translational oncology*. 2006;8(5):318-329.
583. Alencar H, King R, Funovics M, Stout C, Weissleder R, Mahmood U. A novel mouse model for segmental orthotopic colon cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;117(3):335-339. doi:10.1002/ijc.21185
584. Gura T. Cancer Models: Systems for identifying new drugs Are often faulty. *Science*. 1997;278(5340):1041-1042. doi:10.1126/science.278.5340.1041
585. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein L V, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British journal of cancer*. 2001;84(10):1424-1431. doi:10.1054/bjoc.2001.1796
586. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *European journal of cancer*. 2004;40(6):852-857. doi:10.1016/j.ejca.2003.11.021
587. Peterson JK, Houghton PJ. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. *European journal of cancer* (. 2004;40(6):837-844. doi:10.1016/j.ejca.2004.01.003
588. Kamb A. Opinion: What's wrong with our cancer models? *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005;4(2):161-165. doi:10.1038/nrd1635
589. Oliveira RC, Abrantes AM, Tralhão JG, Botelho MF. The role of mouse models in colorectal cancer research—The need and the importance of the orthotopic models. *Animal Models and Experimental Medicine*. Published online March 11, 2020:ame2.12102. doi:10.1002/ame2.12102
590. Romano G, Chagani S, Kwong LN. The path to metastatic mouse models of colorectal cancer. *Oncogene*. 2018;37(19):2481-2489. doi:10.1038/s41388-018-0155-x
591. DE-Souza ASC, Costa-Casagrande TA. ANIMAL MODELS FOR COLORECTAL CANCER. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*. 2018;31(2):e1369. doi:10.1590/0102-672020180001e1369
592. Evans JP, Sutton PA, Winiarski BK, Fenwick SW, Malik HZ, Vimalachandran D, Tweedle EM, Costello E, Palmer DH, Park BK, Kitteringham NR. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2016;98:94-105. doi:10.1016/J.CRITREVONC.2015.10.009
593. Xu Y, Zhang L, Wang Q, Zheng M. Comparison of Different Colorectal Cancer With Liver Metastases Models Using Six Colorectal Cancer Cell Lines. *Pathology & Oncology Research*. Published online March 14, 2020. doi:10.1007/s12253-020-00805-3
594. Georges LMC, De Wever O, Galván JA, Dawson H, Lugli A, Demetter P, Zlobec I. Cell Line Derived Xenograft Mouse Models Are a Suitable in vivo Model for Studying Tumor Budding in Colorectal Cancer. *Frontiers in Medicine*. 2019;6:139. doi:10.3389/fmed.2019.00139

Parte IV

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

NO ÂMBITO DA TESE DE DOUTORAMENTO

1. Artigos publicados em revistas indexadas

1. Rui Caetano Oliveira, Marcos António Gomes, Ana Margarida Abrantes, Edgar Tavares-Silva, Marco Carvalho Oliveira, Mafalda Laranjo, Débora Basílio Queirós, João Casalta-Lopes, Salomé Pires, Lina Carvalho, Rosa Gouveia, Paulo Rodrigues Santos, Denise Gonçalves Priolli, José Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho “Revisiting colorectal cancer animal model - an improved metastatic model for distal rectosigmoid colon carcinoma” (2018) Pathophysiology DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2018.02.002>
2. Martins J, Alexandrino H, Oliveira R, Cipriano MA, Falcão D, Ferreira L, Martins R, Serôdio M, Martins M, Tralhão JG, Prado e Castro L, Castro e Sousa. “Sinusoidal dilation increases the risk of complications in hepatectomy for CRCLM – Protective effect of bevacizumab and diabetes mellitus, serum gamma-glutamyltranspeptidase as predictive factor” (2016) European Journal of Surgical Oncology 42: 713-21 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2016.02.017>
3. Daniela Falcão, Henrique Alexandrino, Rui Caetano Oliveira, João Martins, Luís Ferreira, Ricardo Martins, Marco Serôdio, Mónica Martins, José Guilherme Tralhão, Maria Augusta Cipriano, Francisco Castro e Sousa “Histopathologic Patterns as Markers of Prognosis in Patients undergoing Hepatectomy for Colorectal Cancer Liver Metastases – Pushing growth as an independent risk factor for decreased survival” (2018) European Journal of Surgical Oncology DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2018.03.023>
4. R. C. Oliveira, Henrique Alexandrino, Maria A Cipriano, José Guilherme Tralhão. “Liver Metastases and Histological Growth Patterns: Biological Behavior and Potential Clinical Implications – Another Path to Individualized Medicine?” (2019) Journal of Oncology 2019(83):1-6 DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2019/6280347>
5. Rui Caetano Oliveira, Ana Margarida Abrantes, José Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho “The Role of Mice Models in Colorectal Cancer Research – The need and the importance of the orthotopic model” (2020) Animal Models and Experimental Medicine DOI: <https://doi.org/10.1002/ame2.12102>
6. Rui Caetano Oliveira, Edgar Tavares-Silva, Ana Margarida Abrantes, Hugo Antunes, Paulo Teixeira, Ana Gomes, Ricardo Martins, Emanuel Furtado, Arnaldo Figueiredo, Maria Augusta Cipriano, José Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho. De novo colorectal cancer after liver and kidney transplantation – microenvironment disturbance. (2020) Transplantation Reports DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tpr.2020.100057>

7. Rui Caetano Oliveira, Henrique Alexandrino, Maria Augusta Cipriano, Filipe Caseiro Alves, José Guilherme Tralhão “Predicting liver metastases growth patterns: Current status and future possibilities” (2020) Seminars in Cancer Biology DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semancer.2020.07.007>
8. Maria José Temido*, Rui Caetano Oliveira*, Ricardo Martins, Marco Serôdio Beatriz Costa, César Carvalho, Eva Santos, Luís Ferreira, Paulo Teixeira, Maria Augusta Cipriano, José Guilherme Tralhão, Henrique Alexandrino. Prognostic Factors after Hepatectomy for Gastric Adenocarcinoma Liver Metastases: Desmoplastic Growth Pattern as the Key to Improved Overall Survival – artigo submetido para publicação

2. Comunicações sob a forma de póster, com publicação de resumo em revista indexada

1. Oliveira C, Abrantes AM, Tavares-Silva E, Pires AS, Mamede AC, Gomes MA, Tralhão JG, Cipriano MA, Prado e Castro L, Botelho MF “The role of tumoral microenvironment in primary and secondary colorectal tumors” – 26th European Congress of Pathology, Londres, Reino Unido (30.08 a 03.09.2014) Virchow Archiv supplement
2. Rodrigo Nemésio, M Martins, MJ Koch, MA Cipriano, R Caetano Oliveira, G Tralhão, F Castro e Sousa “Spontaneous regression of colorectal liver metastasis” - 28th European Congress of Pathology/XXXI International Congress of the IAP, Colónia, Alemanha (25 a 29.09.2016) Virchow Archiv supplement
3. Temido MJ, Alexandrino H, Oliveira RC, Santos E, Ferreira L, Martins R, Serôdio M, Castro e Sousa F, Cipriano MA, Tralhão JG (2018) “Predictors of improved overall survival after resection of gastric cancer liver metástases” HPB 20:S341-S342 DOI: 10.1016/j.hpb.2018.06.2556
4. R. Caetano Oliveira, H. Antunes, A.M. Abrantes, E. Tavares Silva, R. Martins, J.G. Tralhão, E. Furtado, M.F. Botelho, M.A. Cipriano. De novo colorectal carcinoma after renal and hepatic transplattation (2019) Virchows Archiv, volume 475, supplement 1

3. Comunicações sob a forma de póster, sem publicação de resumo em revista indexada

1. Rodrigues P, Oliveira C, Silva MR, Martins MJ, Prado e Castro L “Gânglio do Cístico Metastizado – Modo de Apresentação de Carcinoma do Cólon” – 17ª Semana do Interno, Coimbra, Portugal (21 a 25.10.2013)
2. Rui Caetano Oliveira, Henrique Alexandrino, Maria Augusta Cipriano, Ana Margarida Abrantes, Ricardo Martins, José Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho, Lígia Prado e Castro, Francisco Castro e Sousa “Análise de padrões histopatológicos de metástases de carcinoma colorretal e correlação com características do tumor primário” – Encontros da Primavera 2017, Évora, Portugal (20 a 22.04.2017)
3. Rui Caetano Oliveira, Maria José Temido, Henrique Alexandrino, Luís Ferreira, Ricardo Martins, Marco Serôdio, Mónica Martins, Maria Augusta Cipriano, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Metástases Hepáticas de Carcinoma Gástrico: Qual o papel da ressecção? Revisão clínica e patológica da experiência de um serviço” – Encontros da Primavera 2017, Évora, Portugal (20 a 22.04.2017)
4. Rui Caetano Oliveira, Vítor Sousa, Paula Neto, Ângela Jesus, Ricardo Vieira, Maria José Julião, José Guilherme Tralhão, Maria Augusta Cipriano “Metástase cutânea por adenocarcinoma mucinoso com células em anel de sinete – relato de dois casos” – XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar, Portugal (21 a 23.03.2019)

4. Comunicações orais, sem publicação de resumo em revista indexada

1. Caetano Oliveira R, Abrantes AM, Tavares-Silva E, Pires AS, Mamede AC, Gomes MA, Tralhão JG, Botelho MF “Desenvolvimento tumoral primário e secundário de carcinoma colorretal em modelo ortotópico – qual o papel do microambiente tumoral?” – Semana Digestiva 2014, Estoril, Portugal – (04 a 07.06.2014)
2. Martins J, Alexandrino A, Caetano Oliveira R, Falcão D, Martins R, Ferreira L, Serôdio Martins M, Cipriano MA, Tralhão JG, Prado e Castro L, Castro e Sousa F “Hepatotoxicidade da quimioterapia: avaliação histopatológica e relação com a morbidade pós-operatória” – XXXV Congresso Nacional de Cirurgia – Figueira da Foz, Portugal (05 a 07.03.2015)
3. Caetano Oliveira R, Abrantes M, Tavares Silva E, Pires S, Mamede AC, Gomes M, Santos P, Tralhão JG, Cipriano MA, Prado e Castro L, Castro e Sousa F

“Desenvolvimento tumoral primário e secundário de carcinoma colorretal em modelo ortotópico – qual o papel do microambiente tumoral?” – XXXV Congresso Nacional de Cirurgia – Figueira da Foz, Portugal (05 a 07.03.2015)

4. João Martins, Henrique Alexandrino, Rui Caetano Oliveira, Daniela Falcão, Maria Augusta Cipriano, Luís Ferreira, Ricardo Martins, César Carvalho, Marco Serôdio, Mónica Martins, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Síndrome de Obstrução Sinusoidal aumenta a Morbilidade após Ressecção Hepática por Metástases de Cancro Colorrectal” XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal (03 a 05.03.2016)
5. Rui Caetano Oliveira, “Análise de padrões histopatológicos de metástases de carcinoma colorretal e correlação com características do tumor primário – será possível prever o futuro?” – Encontro – a ciência e os internos, Coimbra, Portugal (13 e 14.10.2016)
6. Rui Caetano Oliveira, Henrique Alexandrino, Maria Augusta Cipriano, Ana Margarida Abrantes, Ricardo Martins, José Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho, Lígia Prado e Castro, Francisco Castro e Sousa “Análise de padrões histopatológicos de carcinoma colorretal e correlação com o tumor primário” – XXXVII Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal (16 a 18.03.2017)
7. Maria José Temido, Henrique Alexandrino, Rui Caetano Oliveira, Luís Ferreira, Ricardo Martins, Marco Serôdio, Mónica Martins, Maria Augusta Cipriano, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Metástases hepáticas de carcinoma gástrico: Qual o papel da resseção? Revisão clínica e patológica da experiência de um serviço” – XXXVII Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal (16 a 18.03.2017)
8. Rui Caetano Oliveira, Daniela Falcão, Henrique Alexandrino, João Martins, Maria Augusta Cipriano, Luís Ferreira, Ricardo Martins, César Carvalho, Marco Serôdio, Mónica Martins, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Padrões histológicos como marcadores de prognóstico em doentes submetidos a hepatectomia por metástases de carcinoma colorretal” – Encontros da Primavera 2017, Évora, Portugal (20 a 22.04.2017)
9. Rui Caetano Oliveira, Daniela Falcão, Henrique Alexandrino, João Martins, Maria Augusta Cipriano, Luís Ferreira, Ricardo Martins, César Carvalho, Marco Serôdio, Mónica Martins, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Histological growth pattern of colorectal liver metastasis” – Molecular Pathology Bordeaux-Porto, Bordéus, França (12 a 14.10.2017)
10. Rui Caetano Oliveira, Hugo Antunes, Paulo Teixeira, Ana Margarida Abrantes, Edgar Tavares-Silva, Ricardo Martins, Maria Augusta Cipriano, Dulce Diogo, José

Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho, Arnaldo Figueiredo, Emanuel Furtado
“Carcinoma colorretal de novo após transplante hepático e renal” – 21ª Semana do Interno, Coimbra, Portugal (02 a 05.01.2018)

11. Rui Caetano Oliveira, Hugo Antunes, Paulo Teixeira, Ana Margarida Abrantes, Edgar Tavares-Silva, Ricardo Martins, Maria Augusta Cipriano, Dulce Diogo, José Guilherme Tralhão, Maria Filomena Botelho, Arnaldo Figueiredo, Emanuel Furtado
“Carcinoma colorretal de novo após transplante hepático e renal” – XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar, Portugal (21 a 23.03.2019)
12. Rui Caetano Oliveira, Ângela Jesus, Paula Neto, Ana Lai, Mário Rui Silva, Ricardo Martins, Manuela Meruje, Maria Augusta Cipriano, José Guilherme Tralhão
“Carcinomas colorretais síncronos – a experiência de um serviço” – XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar, Portugal (21 a 23.03.2019)
13. E. Santos, R. Caetano Oliveira, H. Alexandrino, F. Azevedo, R. Martins, M. Serôdio, A. Pinho, A. Velez, H. Baptista, M.A. Cipriano, J.G. Tralhão, H Carvalho “Fatores clínicos e patológicos de prognóstico após resseção hepática por carcinoma da mama” – XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar, Portugal (21 a 23.03.2019)
14. E. Santos, R. Caetano Oliveira, H. Alexandrino, F. Azevedo, R. Martins, M. Serôdio, A. Pinho, A. Velez, H. Baptista, M.A. Cipriano, J.G. Tralhão, H Carvalho Clinical and Pathological Factors of Survival after liver resection of Breast Cancer Liver Metastases – Moderate and Severe Steatosis as a Poor Prognostic Factor, 2019 Annual Meeting Liver Metastasis Research Network, Valência, Espanha (19 a 21.06.2019)
15. Rui Caetano-Oliveira Contribution to the study of the pathophysiology of colorectal cancer liver metastases, 2019 Annual Meeting Liver Metastasis Research Network, Valência, Espanha (19 a 21.06.2019)

5. Comunicações orais, como formador

1. Rui Caetano Oliveira Orador no Curso Avançado de Imagem Biomédica, com o tema “Métodos de Imagem Microscópica”, Coimbra, Portugal (03.02.2014)
2. Rui Caetano Oliveira Orador no Curso Avançado de Imagem Biomédica, com o tema “Métodos de Imagem Microscópica”, Coimbra, Portugal (02.02.2015)
3. Pedro Rodrigues, Rui Oliveira, Carlos Abrantes “Genes Supressores e Promotores do Ciclo Celular” – Patologia Molecular em Medicina VI: Diagnóstico e Terapêutica Personalizada, Coimbra, Portugal (17.06.2016)

4. Rui Caetano Oliveira “Metástases hepáticas de cancro colorectal: a patologia e a oncologia personalizadas” – VIII Jornadas Internacionais de Cirurgia, Coimbra, Portugal (09 a 10.05.2019)
5. Rui Caetano Oliveira, “Avanços em anatomia patológica: padrões histológicos e novos biomarcadores” – Metástases hepáticas de carcinoma colorretal – uma visão multidisciplinar, Coimbra, Portugal (01.02.2020)
6. Pedro Silva Vaz, Rui Oliveira “Curso avançado em Modelos Animais de Doenças Humanas 2020” Programa Doutoral em Medicina 2020

6. Congressos, workshops, simpósios e cursos

1. “Fourth Annual Symposium of the Harvard Medical School – Portugal Program on Immunomedicine”, Coimbra, Portugal (12 e 13.04.2013)
2. Curso “III Workshop on Cancer Research: Biological and Molecular Basis”, creditado com 1 ECTS, obtendo a classificação final de 13 valores, IPATIMUP, Porto (14 a 17.05.2013)
3. III Curso de Patologia Molecular em Medicina no CHUC-HUC, Clínica de Cirurgia Cardiorádica, Coimbra (31.05 e 01.06.2013)
4. “25th European Congress of Pathology”, Lisboa, Portugal (31.08 a 04.09.2013) – congresso creditado com 24 CME credits/ECMECs
5. “The Third TASTE Workshop – Pre-Analytical Issues in Pathology”, IPATIMUP, Porto, Portugal (19.10.2013)
6. Curso Pós-Graduado em Microscopia Eletrónica de Transmissão, com carga horária total de 28h, Southampton, Reino Unido (06 a 09.01.2014)
7. Sessão multidisciplinar IMPACT 2 – Integrating Multidisciplinary Perspectives on CRC Advanced Treatment, Viseu, Portugal (22 e 23.02.2014)
8. “Speed Dating with Cancer: basic biology and beyond”, Coimbra, Portugal (21 e 26.02.2014)
9. “Basic Science Course – Hot Topics in Experimental GI Cancer”, Munique, Alemanha (17 a 19.07.2014)
10. “26th European Congress of Pathology”, Londres, Reino Unido (30.08 a 03.09.2014) – Congresso Creditado com 21 CME credits/ECMECs
11. IV Curso de Patologia Molecular em Medicina – Aplicação do FISH na Rotina da Anatomia Patológica, Coimbra, Portugal (17 a 18.11.2014)
12. 1º Curso Bidual de Introdução Teórica à Biologia Molecular – IPATIMUP, Porto, Portugal (12 a 13.12.2014)
13. XXXV Congresso Nacional de Cirurgia – Figueira da Foz, Portugal (05 a 07.03.2015)
14. Curso “Diagnostic problems in GI tract pathology”, Lisboa, Portugal (10.04.2015)
15. 15º Congresso Sociedade Portuguesa Anatomia Patológica/XVIII Sociedade Portuguesa de Citologia, Évora, Portugal (14 a 16.05.2015)

16. *"27th European Congress of Pathology"*, Belgrado, Sérvia (05 a 09.09.2015) – congresso creditado com 24 CME credits/ECMECs
17. *"Patologia Molecular em Medicina V: Interface Anatomia Patológica & Imunologia"*, Coimbra, Portugal (04.12.2015)
18. ESMO Symposium on Signalling Pathways in Cancer 2016, Sitges, Espanha (3 e 4.03.2016)
19. *"Jornadas Científicas de Ciências Biomédicas Laboratoriais – 3rd Annual Meeting Coimbra Health School"*, Coimbra, Portugal (10.04.2016)
20. *"Patologia Molecular em Medicina VI: "Diagnóstico e Terapêutica Personalizada"*, Coimbra, Portugal (17.06.2016)
21. *"28th European Congress of Pathology/XXXI International Congress of the IAP"*, Colónia, Alemanha (25 a 29.09.2016) – congresso creditado com 24 CME credits/ECMECs
22. *"Encontro – a ciência e os internos"*, Coimbra, Portugal (13 e 14.10.2016)
23. *"XXXVII Congresso Nacional de Cirurgia"*, Figueira da Foz, Portugal (16 a 18.03.2017)
24. *"Encontros da Primavera 2017"*, Évora, Portugal (20 a 22.04.2017)
25. 16º Congresso da Sociedade Portuguesa Anatomia Patológica/19º Congresso da Sociedade Portuguesa de Citologia, Tróia, Portugal (25 a 27.05.2017)
26. *"Molecular Pathology Bordeaux-Porto"*, Bordéus, França (12 a 14.10.2017)
27. ESMO Symposium on Signalling Pathways in Cancer 2018, Barcelona, Espanha (23 e 24.03.2018)
28. *"XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia"*, Tomar, Portugal (21 a 23.03.2019)
29. VIII Jornadas Internacionais de Cirurgia, Coimbra, Portugal (09 a 10.05.2019)
30. 2019 Annual Meeting Liver Metastasis Research Network, Valência, Espanha (19 a 21.06.2019)
31. *"Gastrointestinal Pathology"*, USCAP Course – creditado com 3 SAM (19.04.2020)
32. *"Association for Molecular Pathology: Making TMB Relevant in the Clinic: Best Practices for TMB Calculation, Reporting, and Interpretation"* – creditado com 1 CME (22.05.2020)
33. *"Association for Molecular Pathology: Tumor Mutational Burden: Clinical and Diagnostic Utilization in Oncology"* – creditado com 1 CME (15.06.2020)
34. *"EACR Virtual Congress"* (18 e 19.06.2020)
35. *"Association for Molecular Pathology: Tumor Mutational Burden: Best Practices to Address Clinical and Technical Challenges"* – creditado com 1 CME (17.06.2020)
36. *"Association for Molecular Pathology: Tumor Mutational Burden: Result Reporting and Application to Improve Patient Care"* – creditado com 1 CME (22.06.2020)
37. *"Association for Molecular Pathology: Updates on Tumor Mutational Burden and the Immunotherapy Biomarker Landscape"* – creditado com 1 CME (02.07.2020)

7. Prémios e Distinções

1. *Travel Grant* para o *UEG Basic Science Course on animal models*, Munique, Alemanha
2. *Travel Grant* para o 26th European Congress of Pathology, Londres, Reino Unido
3. *Travel Grant* para o 28th European Congress of Pathology/XXXI International Congress of the IAP, Colónia, Alemanha
4. *Travel Grant* para o 29th European Congress of Pathology, Amsterdão, Holanda
5. *Travel Grant* para ESMO Symposium on Signalling Pathways in Cancer 2016, Sitges, Espanha (3 e 4.03.2016)
6. *Travel Grant* para ESMO Symposium on Signalling Pathways in Cancer 2018, Barcelona, Espanha (23 e 24.03.2018)
7. Vencedor do 1º Prémio a “Ciência e os Internos” no valor de 5,000€ em 2018, com o tema “Carcinoma colorretal de novo após transplante hepático e renal”
8. João Martins, Henrique Alexandrino, Rui Caetano Oliveira, Daniela Falcão, Maria Augusta Cipriano, Luís Ferreira, Ricardo Martins, César Carvalho, Marco Seródio, Mónica Martins, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Síndrome de Obstrução Sinusoidal aumenta a Morbilidade após Ressecção Hepática por Metástases de Cancro Colorrectal" XXXVI Congresso Nacional de Cirurgia, Figueira da Foz, Portugal (03 a 05.03.2016) – Melhor Comunicação Oral
9. Rui Caetano Oliveira, Daniela Falcão, Henrique Alexandrino, João Martins, Maria Augusta Cipriano, Luís Ferreira, Ricardo Martins, César Carvalho, Marco Seródio, Mónica Martins, José Guilherme Tralhão, Francisco Castro e Sousa “Padrões histológicos como marcadores de prognóstico em doentes submetidos a hepatectomia por metástases de carcinoma colorretal” – Encontros da Primavera 2017, Évora, Portugal (20 a 22.04.2017) – vencedor do prémio Melhor Comunicação Oral no valor de 1,500€
10. Rui Caetano Oliveira, Vítor Sousa, Paula Neto, Ângela Jesus, Ricardo Vieira, Maria José Julião, José Guilherme Tralhão, Maria Augusta Cipriano “Metástase cutânea por adenocarcinoma mucinoso com células em anel de sinete – relato de dois casos” – XXXIX Congresso Nacional de Cirurgia, Tomar, Portugal (21 a 23.03.2019) – eleito para os melhores posters do congresso
11. Seleção para participação na 1st European Society of Pathology Academy, Waterloo, Bélgica (23 a 26.06.2018)

8. Submissão de projetos a financiamento

1. Submissão de projeto à Fundação para a Ciência e Tecnologia através do “Concurso para Financiamento de Projetos de Investigação Científica e Desenvolvimento Tecnológico em Todos os Domínios Científicos – 2020” para o estudo do padrão de crescimento das metástases hepáticas de carcinoma colorretal por imagem (ressonância magnética) com aplicação de algoritmos de imagem, sob a designação *“B-Liver – Biomarkers in LIVER” – “Colorectal Cancer Liver metastases subtypes and Prognostic Stratification with Magnetic Resonance Imaging-Derived Biomarkers”* (refª. PTDC/MEC-NUC/6013/2020)