



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

RUI EDUARDO CORREIA BARRETO

Classificação Immunoscore em Carcinoma Colorretal

ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL

ÁREA CIENTÍFICA DE CIRURGIA GERAL

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSOR DOUTOR JOSÉ GUILHERME LOPES RODRIGUES TRALHÃO

DOUTOR RUI PEDRO CAETANO MOREIRA DE OLIVEIRA

JANEIRO/2023

Classificação *Immunoscore* em Carcinoma Colorretal

Rui Barreto¹; Rui Caetano Oliveira^{2,3,4}, MD, PhD; José Guilherme Tralhão^{1,5}, MD, PhD

1. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal
2. *Germano de Sousa - Centro de Diagnóstico Histopatológico CEDAP, Coimbra, Portugal*
3. *Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR)*
4. *Centre of Investigation on Genetics and Oncobiology (CIMAGO)*
5. Clínica Universitária de Cirurgia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal

Índice

Resumo.....	5
<i>Abstract</i>	6
Introdução.....	7
Materiais e Métodos.....	8
Resultados.....	10
Discussão.....	14
Conclusão.....	15
Agradecimentos.....	15
Referências Bibliográficas.....	16
Material Suplementar.....	18

Índice de Figuras e Tabelas

Figura 1.....	9
Figura 2.....	11
Figura 3.....	11
Figura 4.....	12
Figura 5.....	13
Tabela 1.....	13

Abreviaturas

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*.

CHUC – Centro Hospitalar Universitário de Coimbra.

CCR – Carcinoma Colorretal.

HR – *Hazzard Ratio*.

LODDS – *Logarithm of the Ratio between metastatic and nonmetastatic nodes*.

QTA – Quimioterapia Adjuvante.

TLS – *Tertiary lymphoid structures*.

Resumo

Introdução: Apesar dos desenvolvimentos terapêuticos recentes, o carcinoma colorretal (CCR) representa um grande problema de saúde pública. A avaliação do microambiente tumoral no CCR, através do *Immunoscore®*, tem registado importância crescente nos últimos anos, no entanto, trata-se de uma ferramenta dispendiosa, que condiciona a sua empregabilidade na prática clínica corrente. O presente estudo propõe-se a explorar a viabilidade de uma análise histológica menos onerosa em doentes submetidos a cirurgia por esta neoplasia.

Métodos: Foi elaborado um estudo retrospectivo para avaliação da sobrevivência a 5 anos de 98 doentes, a maioria em estágio III, submetidos a cirurgia curativa por CCR no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra (CHUC). Avaliaram-se as suas informações clínicas e anatomopatológicas e avaliou-se a sobrevivência com recurso a curvas de *Kaplan-Meier* e regressão de *Cox*.

Resultados: A análise elaborada demonstrou significância estatística na sobrevivência global dos doentes para o alto grau de inflamação do infiltrado tumoral ($p=0,025$), presença de metástases ganglionares ($p<0,001$), padrão de crescimento tumoral expansivo ($p=0,049$) e estágio do sistema de estadiamento da AJCC. Tumores com alto grau de inflamação apresentaram maior sobrevivência global na avaliação geral e no estágio III da AJCC ($p=0,011$). Na avaliação de regressão de *Cox*, a presença de metástases ganglionares (N+) e o alto grau de inflamação demonstraram significância estatística, *Hazard Ratio* de 4,145 e 0,406 respetivamente, sendo que este primeiro foi o fator independente com maior impacto na sobrevivência global ($p<0,001$). A QTA não demonstrou benefícios nos *outcomes* dos doentes em estágio III.

Discussão: O nosso estudo demonstra que haverá benefício na implementação rotineira da avaliação do infiltrado inflamatório intratumoral e a sua integração em algoritmos de prognóstico de doentes com CCR, sem necessitar de recurso a tecnologia de patologia digital. A coorte de doentes em estágio III apresentou-se bastante heterogénea com diferentes níveis de infiltrado e com respostas dispareas a QTA, devendo, por isso, ser revistas as indicações para a mesma à luz do perfil imune do doente. As conclusões alcançadas são sobreponíveis às presentes em estudos que recorreram à utilização de patologia digital e encontram-se em linha de conta com a evidência científica mais recente.

Conclusão: O presente estudo demonstrou utilidade na avaliação semi-quantitativa do infiltrado inflamatório intratumoral em doentes com CCR, permitindo uma análise eficaz com custos reduzidos, em detrimento de ferramentas mais dispendiosas para efetuar a mesma, tais como o *Immunoscore®*.

Abstract

Introduction: Despite recent therapeutical developments, colorectal cancer (CRC) still represents a public health issue. The evaluation of the tumor microenvironment in CRC, using the Immunoscore®, has been given increasing relevance in the last years; although it is an expensive tool, which limits its application in the routinary clinical practice. The current study aims to explore the viability of an alternative histological analyses with less costs in patients submitted to surgery for this neoplasm.

Methods: A retrospective study was elaborated to assess the overall survival at 5 years of 98 patients, the majority in stage III, submitted to surgery with curative intent for CRC at CHUC. Clinical details and anatomopathological information were obtained and overall survival was analyzed through Kaplan-Meier curves and Cox regression.

Results: The resulting analysis demonstrated that the variables high inflammation status of tumor infiltrate ($p=0,025$), presence of lymph nodes metastases ($p<0,001$), expansive tumoral growth pattern ($p=0,049$) and AJCC stage ($p=0,001$) had statistical significance in overall survival. Tumors with higher inflammatory degree had better outcomes in the general analysis and in subgroup AJCC Stage III ($p=0,011$). The multivariate analysis showed that the presence of lymph nodes metastases (N+) and the high inflammation status were of statistical relevance, with Hazard Ratio of 4,145 and 0,406 respectively, the former pointed as the major independent factor with impact ($p<0,001$) in the overall survival. Adjuvant chemotherapy did not demonstrated benefits in the stage III patients' outcomes.

Discussion: Our study showed that the implementation of evaluation of the intratumoral inflammatory infiltrate in routinary clinical practice, which do not need digital pathology tools, namely in CRC patients' prognostic algorithms is beneficial. Stage III cohort displayed great heterogeneity with different levels of inflammatory response and with diverse responses to adjuvant chemotherapy, leading to review of such indications given the patient's immunological profile. These results align with recent studies that use digital pathology.

Conclusion: The present study demonstrates the utility of semi-quantitative assessment of intratumoral inflammatory infiltrate in CRC patients, allowing for an effective analysis with lesser costs, instead of other more expensive tools, such as the Immunoscore®.

Keywords

Immunoscore®, overall survival; colorectal cancer; immune infiltrate analysis.

Introdução

O cancro colorretal apresenta-se como a terceira neoplasia com maior incidência em todo o mundo [1,2,5,7]. Segundo dados da “*World Cancer Research Fund International*”, Portugal ocupava o 7º lugar no ranking de incidência desta neoplasia em 2020, sendo que estatísticas nacionais apontam para que esta tenha tido a maior incidência e com uma taxa de mortalidade de 45%, segundo dados da Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED).

O estadiamento do cancro colorretal é um dos principais fatores de prognóstico do doente, sendo que a classificação adotada para estes tumores é o sistema de estadiamento da AJCC, com avaliação dos parâmetros: invasão local (T), invasão ganglionar (N) e metastização (M). No entanto, estudos internacionais apontam que esta classificação é insuficiente para a correta avaliação do prognóstico do paciente e caracterização do comportamento tumoral [1-3,5, 7-12].

Sabe-se atualmente que, para além das características intrínsecas ao tumor e relativas ao seu comportamento, a sua interação com o sistema imune do doente tem um papel relevante no estabelecimento do prognóstico [1-3, 6,7,10]. O infiltrado inflamatório presente na margem invasiva do tumor tem demonstrado ao longo dos últimos anos crescente importância nos *outcomes* dos doentes, nomeadamente no que respeita à imunidade adaptativa do doente, as células linfocitárias [8,11,13-15]. Foi desenvolvido um *software* capaz de quantificar linfócitos utilizando marcadores específicos, o *Immunoscore®*. Esta ferramenta permitiu uma análise mais precisa e válida do infiltrado inflamatório tumoral e vários estudos confirmaram a variância na sobrevivência de subgrupos com diferentes graus de inflamação, sugerindo que para níveis mais alto de *Immunoscore®* (maior inflamação) os doentes apresentavam maior sobrevivência global, menor recorrência de doença e maior tempo de vida livre de doença.

Recentemente, Pagès *et al* [15] demonstraram, num estudo que envolveu 13 países da América do Norte, Europa e Ásia, fruto de uma maior objetividade na quantificação do infiltrado inflamatório por análise patológica digital, a validade e precisão do *Immunoscore®* com boa capacidade de reprodução interoperador, até então um fator impeditivo da sua implementação na prática clínica corrente.

No entanto, existe resistência à utilização rotineira desta ferramenta na prática clínica, derivado essencialmente da diferenciação e custos associados. Daqui resulta que não existem ainda algoritmos estabelecidos que reúnam a análise anatomopatológica convencional e a avaliação do microambiente intratumoral.

Paralelamente, um estudo recente [25] demonstra que poderão existir alternativas ao *Immunoscore®*, pois este baseia-se na marcação de linfócitos CD8+, quantificando assim o número destes linfócitos, que poderão estar apenas quiescentes e como tal não desempenhar papel no ataque imunológico à neoplasia. Assim estes autores demonstraram que a avaliação do desempenho de marcadores a jusante na cadeia de reação inflamatória, granzima B e CD68, que traduzem atividade citotóxica das células linfocitárias CD8+, terá capacidade prognóstica igual à quantificação de CD8+ em estádios mais avançados e mesmo superior em estádios mais iniciais, nomeadamente estágio II.

Neste enquadramento, o presente trabalho propõe-se a estudar se uma análise menos dispendiosa da densidade do infiltrado inflamatório em lâminas de hematoxilina-eosina, servindo como alternativa ao *Immunoscore®* mas seguindo os mesmos princípios, complementa a análise histológica convencional, com impacto de previsão da sobrevivência global.

Materiais e Métodos

Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo em doentes submetidos a cirurgia com intuito curativo para cancro colorretal entre 2016-2018 no CHUC. Excluíram-se doentes submetidos a quimioterapia e radioterapia neoadjuvante, bem como doentes com tumores do reto, da transição reto-sigmóidea, neoplasias *in situ* e do apêndice ileocecal.

O presente estudo teve autorização da comissão de ética da instituição (CHUC 137-20).

Características da amostra

Foram recolhidos dos processos clínicos dos doentes as seguintes variáveis: idade do doente, tamanho do tumor e número de gânglios recolhidos, sendo posteriormente agrupados em 2 subgrupos (menor ou igual à mediana dos dados ou superior a esta); género, agrupado em género masculino ou género feminino; localização do tumor primário (cego, cólon ascendente, ângulo hepático cólon transversal, ângulo esplénico, cólon descendente e cólon sigmoide) seguida por subclassificação simplificada em cólon direito, compreendendo os tumores do cólon desde a válvula ileocecal até ao ângulo esplénico, exclusive, e em cólon esquerdo, compreendendo os tumores do ângulo esplénico, inclusive, até ao cólon sigmoide; componente T e N do sistema TNM, sendo o componente T subdividido em 4 classes (1, 2, 3 e 4) e o componente N em 7 classes (0, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b e 3a), havendo posteriormente simplificação do N em N+, traduzindo qualquer classe de N exceto a classe 0, ou N-, equiparável à classe 0; estadiamento AJCC com 4 classes (I, II, III e IV), classificadas segundo a 8ª edição [21, 22].

Em cada amostra calculou-se ainda o LODDS através do logaritmo do ratio entre gânglios com metástases e gânglios sem metástases.

Análise Histopatológica

Amostras histológicas arquivadas de peças tumorais foram revistas por um patologista experiente sem conhecimento da informação clínica nem do *outcome* dos doentes. A revisão efetuou-se em lâminas com coloração de hematoxilina-eosina.

As características estudadas foram recolhidas e posteriormente classificadas. O tipo de estroma tumoral foi analisado com base na frente desmoplásica extramural do tumor, sendo que foram classificadas como maduras, quando o estroma fibroso não continha estroma mixoide ou quando as fibras de colagénio *keloide-like* eram constituídas por fibras finas e maduras estratificadas, e como imaturas, quando o estroma fibrótico apresentava alterações mixoides [20]. O padrão de crescimento tumoral foi classificado em padrão expansivo, quando a margem do tumor se encontrava envolta numa bainha fibrosa, e padrão infiltrativo, quando a frente tumoral avançava de forma irregular [23]. O parâmetro *Budding tumoral* agrupado em classe Bd1 quando presentes até 5 *Buds* tumorais num campo de 0,785mm² ou Bd2 quando presente mais de 5 *Buds* tumorais por 0,785mm² [16-18]. No grau de inflamação do parênquima tumoral foi realizada uma análise semi-quantitativa da densidade do infiltrado inflamatório em microscopia. Este parâmetro foi subdividido em inflamação ausente, grau ligeiro, moderado ou severo e posteriormente agrupados em graus de inflamação simplificados em baixo grau, compreendendo a ausência de inflamação e inflamação ligeira, e em alto grau, compreendendo esta a inflamação moderada a severa. Por fim, na avaliação de TLS, classificaram-se as amostras quanto à ausência ou presença das mesmas [19].

A Figura 1 ilustra imagens da análise histológica a nível do grau de inflamação intratumoral e padrão de crescimento tumoral.

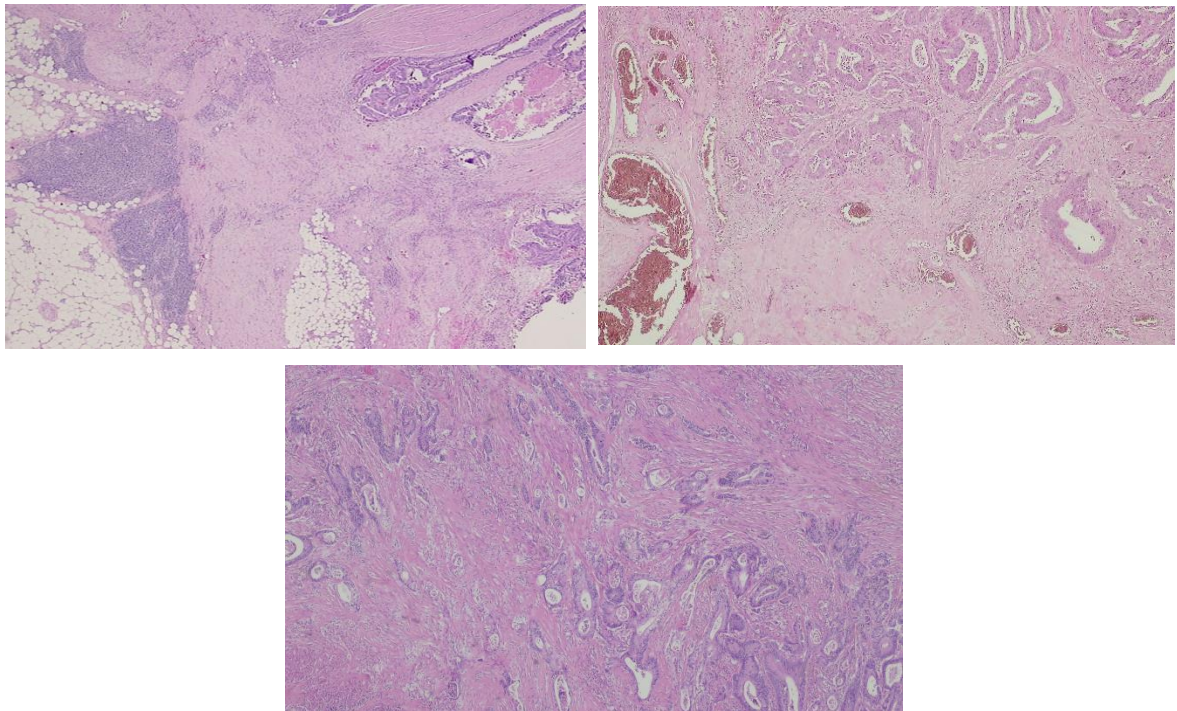


Figura 1 – Imagens histológicas em hematoxilina e eosina representativas de alto grau de inflamação (ampliação x20; esquerda), baixo grau de inflamação (ampliação x20; direita) e padrão de crescimento tumoral expansivo (ampliação x100; inferior).

Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada através do programa SPSS versão 27 para *Windows*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

A sobrevivência global foi definida como o tempo, em meses, decorrido entre a intervenção cirúrgica e a morte do doente ou até à data de *follow-up*, correspondente à última entrada registada no sistema informático do CHUC. Recidiva foi definida como o reaparecimento da neoplasia após cirurgia, nomeadamente aumento dos valores de marcador tumoral CEA, em meses.

A análise da sobrevivência foi realizada através da elaboração de curvas de *Kaplan-Meier*, submetidas posteriormente a teste de *Log-rank* para apreciar possíveis diferenças entre os vários grupos. Utilizou-se, igualmente, curvas ROC para apreciação da sensibilidade das variáveis estudadas em prever uma maior sobrevida. Por fim, obteve-se uma análise multivariada com auxílio de uma regressão de *Cox*.

Os possíveis vieses de seleção foram controlados por aleatorização da seleção dos 98 doentes e o viés de censura foi controlado através da análise multivariada com recurso à regressão de *Cox* e revisão dos processos clínicos dos doentes para confirmação da sobrevida.

Resultados

Características da Amostra

A descrição da amostra encontra-se no formato de tabela na secção Material Suplementar.

A amostra recolhida engloba 98 doentes com mediana de idades de 71 anos (40-91), pertencendo 69 (70,4%) destes doentes ao sexo masculino.

A localização tumoral mais prevalente foi ao nível do cólon ascendente com 35 doentes (35,7%), seguindo-se o cólon sigmoide 26 (26,5%), cólon transverso 11 (11,2%), cego 10 (10,2%), ângulo hepático 6 (6,1%), cólon descendente 6 (6,1%) e ângulo esplénico 4 (4,1%). Utilizando a classificação simplificada, 63,3% dos tumores localizavam-se ao cólon direito e os restantes 36,7% ao cólon esquerdo.

A mediana do tamanho das peças tumorais foi de 4 cm (1-14); de todos os doentes 57,14% tiveram tumores com mais de 4 cm.

O número de gânglios recolhidos para análise anatomopatológica teve uma mediana de 19 gânglios por amostra, variando de 3 a 54 gânglios recolhidos; Quarenta e quatro (44,9%) doentes tiveram mais de 19 gânglios recolhidos. Calculou-se ainda o LODDS, sendo que a mediana foi de 0,0001 (0,0001-0,59).

Segundo o método de estadiamento da AJCC 8ª edição, 16 (16,3%) doentes encontravam-se no estágio I, 46 (46,9%) no estágio II, 32 (32,7%) no estágio III e 4 (4,1%) no estágio IV. Em termos de T 5 (5,1%) doentes foram classificados como T1, 13 (13,3%) como T2, 48 (49%) como T3 e 32 (32,7%) como T4. Quanto ao N 64 (65,3%) doentes apresentavam N0 (N-).

Quanto à variável *Tumor Budding* 84 (85,7%) das amostras apresentavam Bb1 (*budding low*). O padrão de crescimento tumoral expansivo esteve presente em 40 (40,8%) das amostras e as restantes 58 (59,2%) apresentavam padrão infiltrativo. O tipo de estroma encontrado nas amostras foi do tipo maduro em 64 (65,3%) e imaturo em 34 (34,7%).

O padrão inflamatório apresentou um grau ligeiro em 37 (37,8%) das amostras, grau moderado em 31 (31,6%) e grau severo em 17 (17,3%), estando ausente em 13 (13,3%). Aplicou-se uma escala simplificada para a variável inflamação, sendo que a classe “baixo grau” compreende inflamação ausentes e ligeira e a classe “alto grau” inflamação moderada e severa, com 50 (51%) das amostras apresentavam um baixo grau de inflamação.

A presença de TLS nas amostras foi objetivada em 28 (28,6%) das amostras.

Sobrevivência Global

O tempo de *follow-up* teve uma mediana de 43,5 meses, variando entre 0 e 68 meses. Apenas 2 (2%) doentes desenvolveram recidiva do seu cancro. Vinte e sete (27,6%) doentes faleceram dentre os quais 21 (21,4%) devido a complicações da doença neoplásica.

A sobrevivência global estimada foi de 54,5 ± 2,4 meses (IC95%: 49,8-59,1).

Da análise individual das variáveis, a existência de gânglios linfáticos com metástase demonstrou pior sobrevivência, com sobrevida de 40,8 ± 4,6 meses (IC95%: 31,8-49,7) comparativamente a 61,3 ± 2,2 meses (IC95%: 57,1-65,6) nos doentes sem metástases ($p < 0,001$; Figura 1).

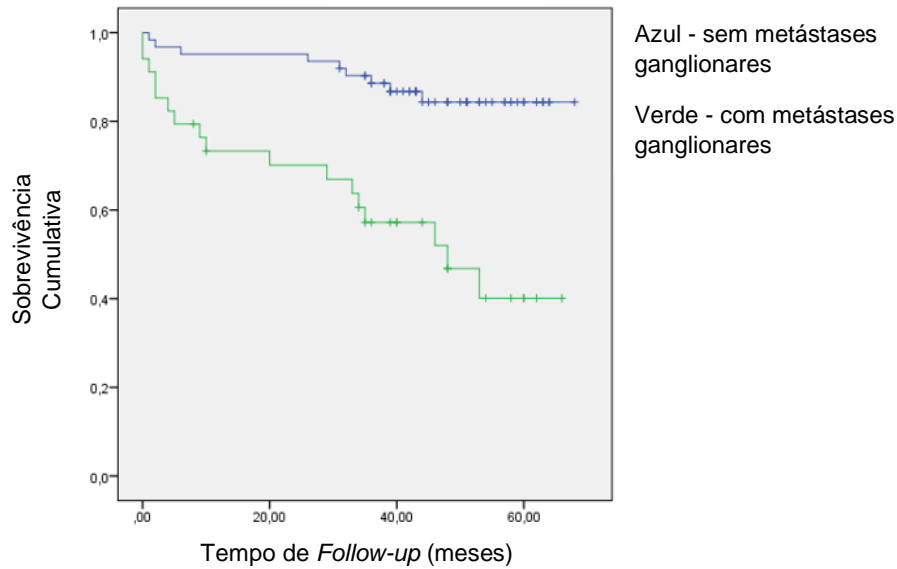


Figura 2 – Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com a presença ou ausência de Gânglios com Metástases

O padrão de crescimento tumoral expansivo apresentou impacto positivo na sobrevivência global, tendo uma sobrevida de 56 ± 31 meses (IC95%: 49,9-62,2), comparativamente a $51,3 \pm 3,2$ meses (IC95%: 45-57,5) nos doentes com padrão infiltrativo ($p=0,049$).

O grau de inflamação manifestou diferenças significativas, sendo que o alto grau de inflamação se correlaciona com uma maior sobrevida comparando com o baixo grau de inflamação, $60 \pm 2,7$ meses (IC95%: 54,9-65,4) e $48 \pm 3,6$ meses (IC95%: 41-55), respetivamente, ($p=0,025$; Figura 2).

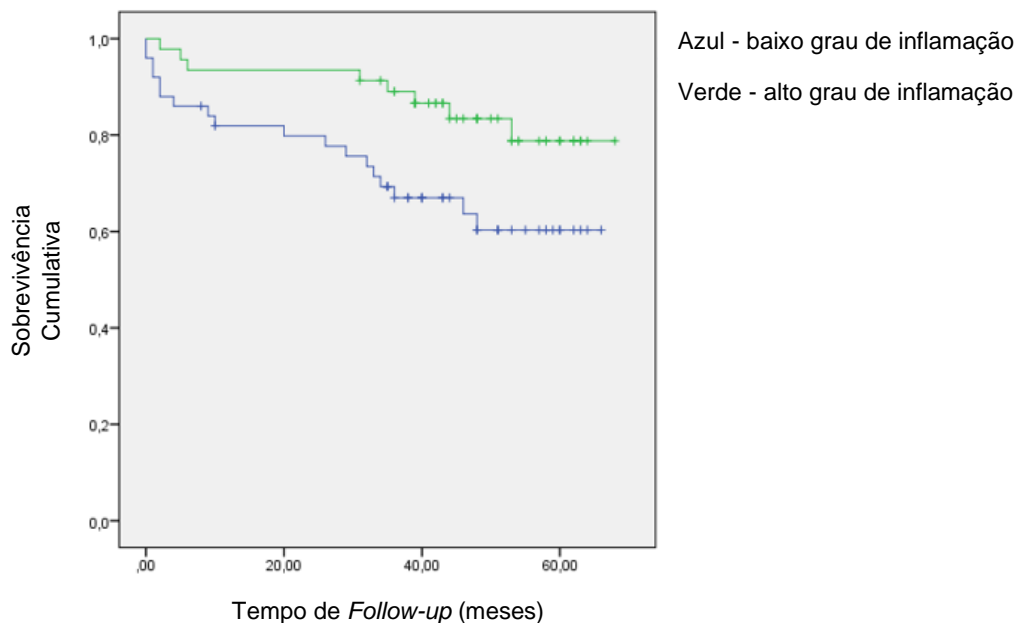


Figura 3 – Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o grau de inflamação

O sistema de estadiamento da AJCC demonstrou igualmente impacto na sobrevida, sendo que o aumento do estágio apresenta valores de sobrevivência progressivamente mais baixos (estádio I $63,8 \pm 2,8$ meses (IC95%: 58,4-69,2); estágio II $56,8 \pm 2,6$ meses (IC95%: 51,7-62);

estádio III $40,7 \pm 4,8$ meses (IC95%: 31,4-50); estágio IV $53,3 \pm 7,9$ meses (IC95%: 37,9-68,8); $p=0,002$; Figura 4).

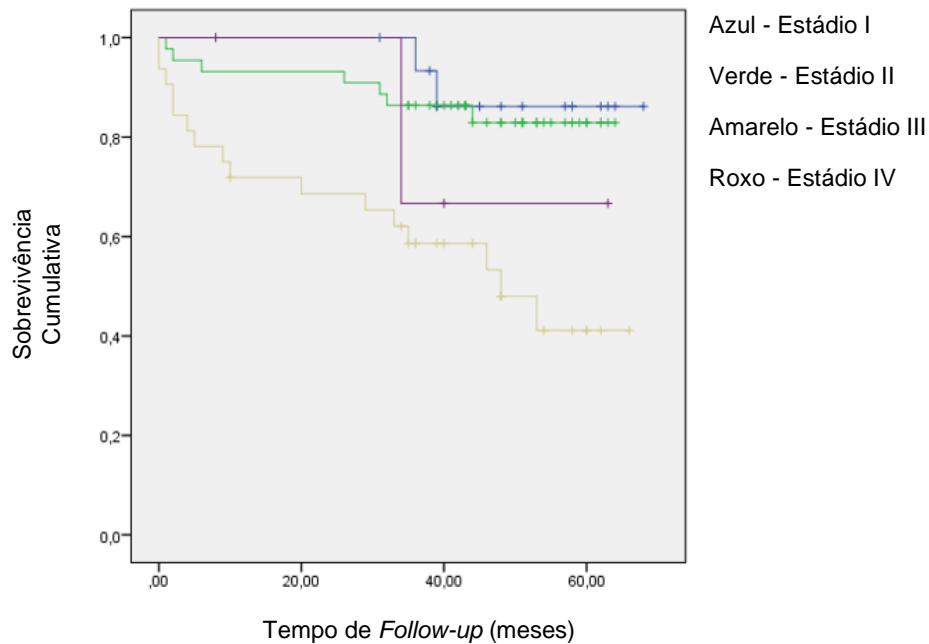


Figura 4 – Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o estadiamento da American Joint Committee on Cancer

Os restantes parâmetros não mostraram significância estatística. Quanto ao tipo de estroma o tipo Maduro apresentou sobrevivência de $51,7 \pm 2,9$ meses (IC95%: 46-57,3) comparado ao tipo Imaturo com $58 \pm 3,8$ meses (IC95%: 50,5-65,4) com $p=0,245$. A presença de TLS apresentou uma sobrevivência estimada de $58,1 \pm 2,1$ (IC95%: 53,9-62,3) em oposição à sua ausência com sobrevivência de $52 \pm 3,1$ meses (IC95%: 45,8-58,1), com $p=0,262$. Por último, doentes que foram submetidos a QTA apresentaram sobrevivência de $51,6 \pm 2,8$ meses (IC95%: 46-57,1) em comparação com os que não foram submetidos com $53,2 \pm 3,7$ meses (IC95%: 46-60,4), com $p=0,971$.

Efetou-se uma análise das variáveis padrão de crescimento (Figura 9), tipo de estroma (Figura 10), grau de inflamação (Figura 11) e presença de TLS (Figura 12) no estágio III da classificação da AJCC, tendo desta avaliação resultado que apenas o grau de inflamação apresentou significância estatística. Doentes com alto grau de inflamação demonstraram maior sobrevida que doentes com baixo grau, $53,3 \pm 4,9$ meses (IC95%: 43,6-62,9) comparando com $30,5 \pm 5,9$ meses (IC95%: 19-59,1) com $p=0,011$, respetivamente. A sobrevivência dos doentes com padrão expansivo foi de $45,8 \pm 7,1$ meses (IC95%: 31,9-59,7) comparado a $35,3 \pm 5,5$ meses (IC95%: 24,4-46,1) no padrão infiltrativo com $p=0,068$. Os doentes com tipo de estroma maduro sobreviveram em média $37,1 \pm 5,6$ meses (IC95%: 26,1-48,2) enquanto os com tipo imaturo sobreviveram $46,4 \pm 7,7$ meses (IC95%: 31,2-61,5) com $p=0,177$. Os doentes em que se observou a presença de TLS sobreviveram em média $52,7 \pm 2$ meses (IC95%: 48,7-56,6), enquanto que a ausência de TLS resultou numa sobrevivência média de $37,2 \pm 5,7$ meses (IC95%: 25,9-48,4) com $p=0,274$. Dentro da análise ao estágio III, investigou-se a influência da QTA nos subgrupos de inflamação simplificada (baixo grau e alto grau), tendo sido encontrada diferença significativa na sobrevivência do subgrupo não submetido a QTA (Figura 13). No subgrupo submetido a QTA, os doentes com baixo grau de inflamação sobreviveram $36,6 \pm 6,4$ meses (IC95%: 24,1-49,1) enquanto que os com alto grau sobreviveram $49,2 \pm 8$ meses (IC95%: 33,6-64,9) com $p=0,214$; no subgrupo não submetido

a QTA, os doentes com baixo grau de inflamação sobreviveram $15,8 \pm 8,5$ meses (IC95%: 0-32,3) comparativamente a $57,7 \pm 1,9$ meses (IC95%: 53,9-61,4) no alto grau, $p=0,025$.

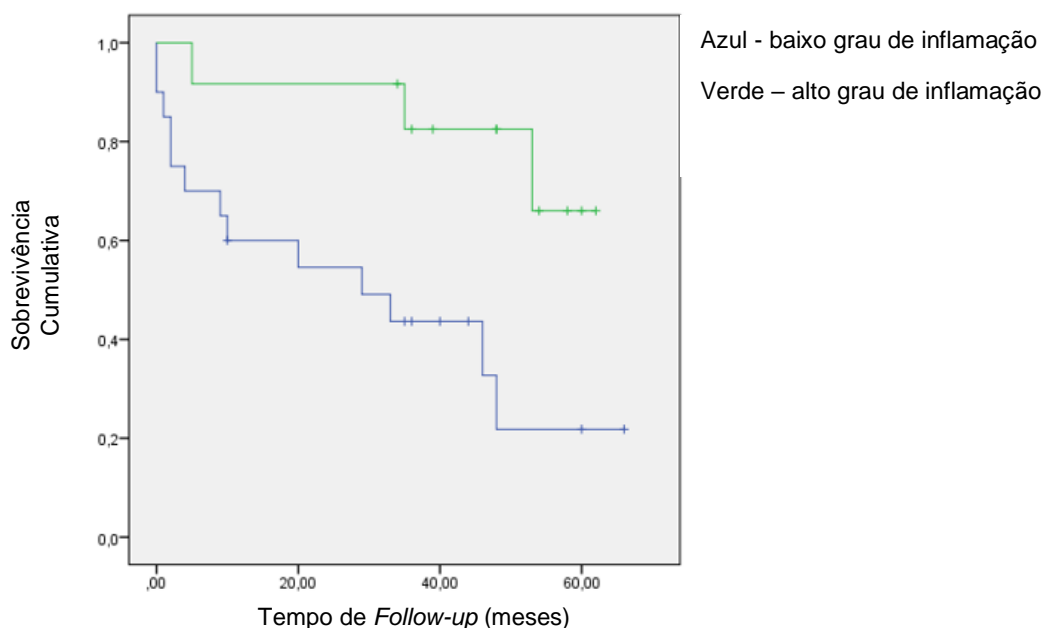


Figura 5 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o grau de inflamação

A análise multivariada (Tabela 1) com regressão de Cox mostrou que o estado N+ apresentava um HR de 4,145 ($p=0,01$, IC95%: 1,82-9,45), confirmando a presença de gânglios metastáticos como principal fator de mau prognóstico. A presença de maior grau de inflamação apresenta-se como fator protetor com um HR de 0,406 ($p=0,037$, IC95%: 0,17-0,945).

Tabela 1 - Análise Multivariada

	B	df	Sig.	Exp(B)
Padrão	-0,914	1	0,052	0,401
Inflamação Simplificada	-0,902	1	0,037	0,406
N+	1,422	1	0,001	4,145

Das variáveis que demonstraram significância estatística foram aplicadas outra análise com curvas ROC procurando estabelecer um *cut-off* a partir do qual as variáveis demonstrem maior especificidade para menores valores de sobrevida global.

A análise de curvas ROC aponta para um poder de discriminação aceitável com $AUC = 0.705$ ($p= 0.002$) para o ratio entre gânglios com metástases e gânglios sem metástases. Um poder discriminativo fraco para o número de gânglios com metástases, $AUC= 0,699$ ($p=0,003$) e o tamanho dos tumores, $AUC=0,561$ ($p=0,362$). Não foi encontrado poder discriminativo para LODDS, $AUC =0,460$ ($p=0.680$).

Foi igualmente elaborada análise ROC dentro do subgrupo de doentes em estágio III da AJCC analisando as variáveis Número de gânglios com metástases ($AUC=0,640$, $p=0,185$) e Raio gânglios metastizados/gânglios sem metástases. ($AUC=0,673$, $p=0,101$).

Restantes tabelas e gráficos da análise encontram-se na secção Material suplementar.

Discussão

Pela sua prevalência, o CCR continua a ser alvo de vários estudos a nível mundial. Estudos esses que demonstraram a imprecisão do modelo de estadiamento convencional em prever a sobrevivência destes doentes e estabelecer prognósticos [1-3,5,7-12].

O estudo do microambiente, quer intratumoral quer na margem invasiva do tumor, nomeadamente através da aplicação do *Immunoscore*®, tem ganho importância nos últimos anos com eficácia demonstrada em estudos a nível global [8,11,13-15]. De entre estes dois preditores, a análise do microambiente intratumoral demonstra ter maior implicação em termos prognósticos. No entanto, a sua empregabilidade na prática corrente ainda sofre resistências em muito devido ao custo das técnicas.

Este estudo conseguiu demonstrar o benefício de abordar o microambiente imunológico intratumoral através de uma avaliação pouco dispendiosa do infiltrado inflamatório e grau de inflamação. Desta avaliação em lâminas de hematoxilina-eosina da inflamação tumoral resultou uma diferença significativa entre o subgrupo com alto grau de inflamação e baixo grau de inflamação, sendo que no primeiro observou-se aumento da sobrevida global quer na análise geral da amostra, quer na análise dentro do estágio III da AJCC. Estes resultados estão de acordo com a evidência científica mais recente que associa maiores níveis de infiltrado inflamatório tumoral, nomeadamente células T, com melhores *outcomes*, como sobrevivência livre de doença, tempo até recidiva e sobrevivência global [2-6, 9-15].

A mais recente evidência sugere que doentes em estágio III da AJCC beneficiariam de uma revisão das indicações para QTA, dependendo do grau de inflamação apresentado. Para altos valores de *Immunoscore*® demonstrou-se que indivíduos submetidos a QTA apresentavam maiores valores de sobrevivência global e de sobrevivência livre de doença [3,7]. Contrariamente, em doentes com baixos valores de *Immunoscore*®, a QTA não demonstrou diferença significativa nos *outcomes* estudados. Consequentemente, afirmou-se que as indicações para QTA deveriam incluir uma análise do infiltrado tumoral, tendo altos valores de *Immunoscore*® sido apontado como preditor de bom prognóstico. Daqui resultaria que os doentes com baixos níveis poderiam ser poupados de serem submetidos a QTA que não demonstra melhoria na sua sobrevivência e que, por outro lado, aumenta morbilidades. A análise feita neste estudo não conseguiu reproduzir totalmente estes resultados; no estágio III os doentes submetidos a QTA com alto grau de inflamação demonstraram melhor sobrevivência global que os submetidos a QTA com baixo grau de inflamação, no entanto, sem significância estatística. Esta discordância poderá advir de um baixo número de doentes estudados neste estágio, sendo que os doentes submetidos a QTA com alto grau de inflamação apresentaram melhor sobrevivência global e, portanto, com aumento do número de doentes estudados poderia demonstrar significância. Este facto vem sustentar os resultados de outros estudos que especulam o benefício de QTA apenas em tumores selecionados, antevendo que doentes com valores mais altos de *Immunoscore*®, poderão beneficiar mais terapêuticas adjuvantes, comparativamente a menores valores que aparentam menor resposta [3,7].

A escala simplificada de grau de inflamação juntamente com o *status* N+ destacaram-se como variáveis com impacto independente na análise multivariada efetuada. O grau de inflamação demonstrou impacto prognóstico positivo, corroborando achados em outros estudos que classificam esta variável como melhor preditor independente dos *outcomes* já referidos [2-6, 8-10, 13-15].

Paralelamente, a análise de sobrevivência realizada veio confirmar outros indicadores de prognóstico já previamente estabelecidos, como o número de gânglios com metástases,

apresentando um impacto prognóstico negativo, o padrão de crescimento tumoral expansivo, associado a uma maior sobrevivência e o estadiamento da AJCC, observando-se que a sobrevivência dos doentes é progressivamente menor à medida que apresentam estágio mais elevado [21-23]. De salientar que no referente à variável estadiamento da AJCC neste estudo, o estágio III demonstrou piores *outcomes* que o estágio IV, situação derivada do facto de a este último subgrupo pertencerem apenas 4 doentes comparativamente a 32 no estágio III.

A análise de concordância com curvas ROC aponta para uma boa capacidade discriminatória do ratio entre gânglios metastizados e gânglios sem metástases e uma capacidade preditiva do número de gânglios mais fraca. Esta constatação é também corroborada por outros estudos que apontam para que o fator mais determinante a nível da avaliação ganglionar aquando do estudo anatomopatológico é o ratio mais do que o número de gânglios afetados, equivalente à presença de N+ [24]. O mesmo estudo indica que os LODDS serão, igualmente, bons preditores de sobrevivência, facto não constatado neste estudo, atribuindo-se ao número insatisfatório de gânglios recolhidos em algumas peças anatomopatológicas.

O nosso estudo apresenta por certo algumas limitações. Nos estudos mais recentes na área do *Immunoscore*®, o objetivo principal decorre da evidência de um aumento do tempo até recidiva dos doentes analisados com maior grau de inflamação tumoral, no entanto, neste estudo não foi este o objetivo aplicado, pois dos 98 doentes selecionados apenas 2 desenvolveram recidiva durante o decorrer da análise. A avaliação das peças tumorais foi efetuada por um anatomopatologista em lâminas de hematoxilina-eosina. O estudo de Pagès F, et al [15] sugere que avaliações realizadas nestas condições apresentam fraca reprodutibilidade, constituindo uma análise subjetiva. Porém, atendendo à maior acessibilidade e boa acuidade discriminativa demonstrada nesta análise, mais estudos serão requeridos para estabelecer o grau de reprodutibilidade da mesma.

Conclusão

O presente estudo confirma que a avaliação do microambiente tumoral tem impacto prognóstico na sobrevida global dos doentes com CCR. A maiores graus de inflamação correspondeu maior sobrevida global, enquanto menor inflamação local se correlacionava com menor sobrevida global.

Pode-se apreciar que a avaliação semi-quantitativa efetuada é uma alternativa viável à sofisticação técnica utilizada no *Immunoscore*®, sendo uma análise menos dispendiosa passível de empregabilidade na prática rotineira.

Atendendo às limitações do trabalho, são necessários mais estudos com maior número de gânglios estudados e por forma a efetuar avaliações mais rigorosas e objetivas.

Agradecimentos

A ti que sempre acreditaste em mim; a ti, querida mãe.

Bibliografia

1. Zhou R, Zhang J, Zeng D, Sun H, Rong X, Shi M, et al. *Immune cell infiltration as a biomarker for the diagnosis and prognosis of stage I-III colon cancer. Cancer Immunology, Immunotherapy* (2019) 68:433–442.
2. Ros-Martínez S, Navas-Carrillo D, Alonso-Romero JL, Orenes-Piñero E. *Immunoscore: a novel prognostic tool. Association with clinical outcome, response to treatment and survival in several malignancies. (2020) Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*
3. Galon J, Lanzi A. *Immunoscore and its introduction in clinical practice. (2020). Edizioni Minerva Medica.*
4. Ogino SO, Giannakis M. *Immunoscore for (colorectal) cancer precision medicine. (2018) Lancet. 2018 May 26; 391(10135): 2084–2086.*
5. Jorissen R, Sakthianandeswaren A, Sieber O. *Immunoscore – has it scored for colon cancer precision medicine? (2018) Ann Transl Med 2018;6(Suppl 1):S23*
6. Mlecnik B, Bindea G, Angell H, Valge-Archer V, Latouche JB, Galon J. *Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. (2016) Elsevier Immunity 44, 698–711.*
7. Mlecnik B, Bifulco C, Bindea G, Marliot F, Lugli F, Lee J, et al. *Multicenter International Society for Immunotherapy of Cancer Study of the Consensus Immunoscore for the Prediction of Survival and Response to Chemotherapy in Stage III Colon Cancer. (2020). J Clin Oncol 38:3638-3651.*
8. Lanzi A, Sinicrope FA, Benson AB, Galon J. *The consensus Immunoscore in phase 3 clinical trial (N0147) and impact on patient management decisions. (2020) Oncoimmunology, Vol. 9. No. 1, 1-3.*
9. Pagès F, Taieb J, Laurent-Pulg P, Galon J. *The consensus Immunoscore in phase 3 clinical trials; potential impact on patient management decisions. (2020) Oncoimmunology. Vol. 9, No. 1, e1812221.*
10. Lanzi A, Pagès F, Lagorce-Pagès C, Galon J. *The consensus immunoscore: toward a new classification of colorectal cancer. (2020) Oncoimmunology, Vol. 9, No. 1, 1-3.*
11. Bruni D, Angell H, Galon J. *The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. (2020) Nature Reviews Cancer*
12. Angell H, Bruni D, Barrett C, Herbst R, Galon J. *The Immunoscore: Colon Cancer and Beyond. (2019) American Association for Cancer Research.*
13. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell H, Berger A, Lagorce C, et al. *Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. (2013) J Pathol; 232: 199-209.*
14. Marliot F, Pagès F, Galon J. *Usefulness and robustness of Immunoscore for personalized management of cancer patients. (2020) Oncoimmunology. Vol. 9, No 1, e1832324.*
15. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, OU FS, Bifulco C, et al. *International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. (2018) Lancet.*
16. Rogers AC, Winter DC, Heeney A, Gibbons D, Lugli A, Puppa G, et al. *Systematic review and meta-analysis of the impact of tumour budding in colorectal cancer. (2016) British Journal of Cancer, 115, 831–840.*

17. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. *Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016.* (2017) *Modern Pathology* (2017) 30, 1299–131.
18. Lugli a, Zlobec I, Berger MD, Kirsch R, Nagtegaal ID. *Tumour budding in solid cancers.* (2021) *Nature Reviews| Oncology Reviews*; Vol 18.
19. Posch F, Silina K, Leibl S, Mündlein A, Moch H, Siebenhüner A, et al. *Maturation of tertiary lymphoid structures and recurrence of stage II and III colorectal cancer.* (2018) *Oncoimmunology*, Vol. 7, N° 2, e1378844.
20. Hacking S, Ebare K, Angert M, Lee L, Vitkovski T, Thomas R, et al. *Immature Stroma and Prognostic Profiling in Colorectal Carcinoma: Development and Validation of Novel Classification Systems.* (2020) *Pathology – Research and Practice* 216, 152970.
21. Weiser MR. *AJCC 8th Edition: Colorectal Cancer.* (2018) *Ann Surg Oncol*.
22. Gress DM, Edge SB, Greene FL, Washington MK, Asare EA, Brierley J, et al. *Principles of Cancer Staging.*(2017) *American Joint Committee on Cancer*.
23. Rajaganeshan R, Prasad R, Guillou PJ, Chalmers CR, Scott N, Sarkar R, et al. *The influence of invasive growth pattern and microvessel density on prognosis in colorectal cancer and colorectal liver metastases.* (2007) *British Journal of Cancer* 96, 1112-1117.
24. Bagar A, Wilkins S, Wang W, Oliva K, McMurrick P. *Log odds of positive lymph nodes is prognostically equivalent to lymph node ratio in non-metastatic colon cancer.* (2020) *BMC Cancer* 20:762.
25. Noti L, Galván J, Dawson H, Lugli A, Berger M, Kirsch R, et al. *A combined spatial score of granzyme B and CD68 surpasses CD8 as an independent prognostic factor in TNM stage II colorectal cancer.* (2022) *Research Square*.

Material Suplementar

Tabela 1- Estadiamento de AJCC 8ª Edição (Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition. Springer International Publishing. 2017).

Estádio	T	N	M
I	T1-T2	0	0
II	T3-T4	0	0
III	Qualquer T	N positivo	0
IV	Qualquer T	Qualquer N	1

Tabela 2 - Análise Descritiva da Amostra

Parâmetros	Número de doentes (%)
Idade	
≤71	50 (51,02)
>71	48 (48,98)
Género	
Masculino	69 (70,4)
Feminino	29 (29,6)
Localização Simplificada	
Cólon direito	62 (63,3)
Cólon esquerdo	36 (36,7)
Localização Específica	
Cego	10 (10,2)
Cólon Ascendente	35 (35,7)
Cólon Descendente	6 (6,2)
Cólon Transverso	11 (11,1)
Ângulo Hepático	6 (6,2)
Ângulo Esplénico	4 (4,1)
Sigmoide	26 (26,5)
Tamanho	
≤4	42 (42,86)
>4	56 (57,14)

Número de Gânglios	
≤19	54 (55,1)
>19	44 (44,9)
T	
1	5 (5)
2	13 (13,3)
3	48 (49)
4	32 (32,7)
N	
0	64 (65,3)
1a	14 (14,3)
1b	8 (8,2)
1c	2 (2)
2a	5 (5,1)
2b	4 (4,1)
3a	1 (1)
N positivo	
Positivo	64 (65,3)
Negativo	34 (34,7)
Estadiamento AJCC	
I	16 (16,3)
II	46 (46,9)
III	32 (32,7)
IV	4 (4,1)
<i>Tumour Budding</i>	
Bd1	84 (85,7)
Bd2	14 (14,3)
Padrão de Crescimento Tumoral	
Expansivo	40 (40,8)
Infiltrativo	58 (59,2)

Tipo de Estroma Tumoral	
Maduro	64 (65,3)
Imaturo	34 (34,7)
Inflamação Estroma Tumoral	
Ausente	13 (13,3)
Ligeira	37 (37,8)
Moderada	31 (31,6)
Severa	17 (17,3)
Inflamação Simplificada	
Baixo grau	50 (51)
Alto grau	48 (49)
<i>Tertiary lymphoid structures</i>	
Ausente	70 (71,4)
Presente	28 (28,6)

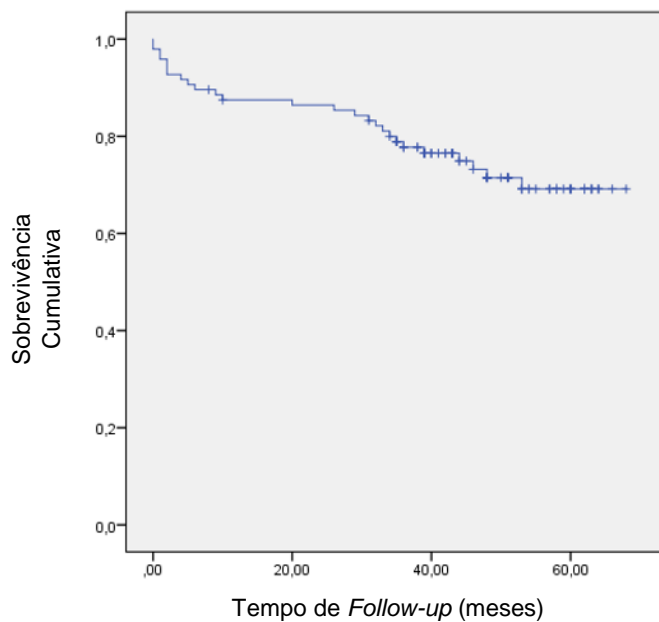


Figura 1 - Sobrevivência Global de Doentes operados por carcinoma colorretal

Tabela 3- Sobrevivência Global de doentes operados por carcinoma colorretal

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Sobrevivência Global (SG)	54,5	2,4	49,8	59,1

Tabela 4 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com a presença ou ausência de Gânglios com Metástases

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
N-	61,3	2,2	57,1	65,6
N+	40,8	4,6	31,8	49,7

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	16,9	1	<0,001

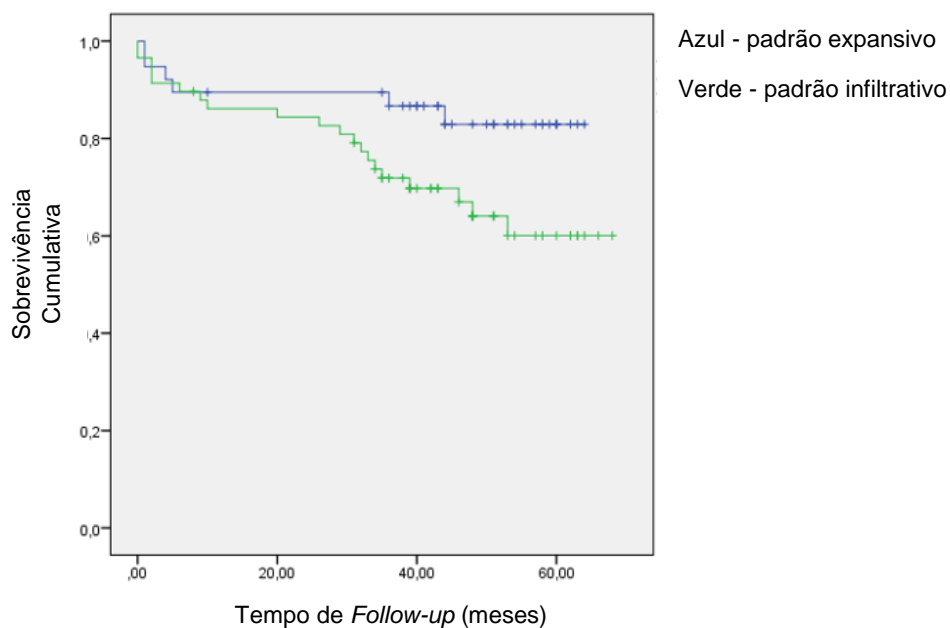


Figura 2 – Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o padrão de Crescimento tumoral

Tabela 5 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o padrão de crescimento tumoral.

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Padrão Expansivo	56,0	3,1	49,9	62,2
Padrão Infiltrativo	51,3	3,2	45	57,5

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	3,9	1	0,049

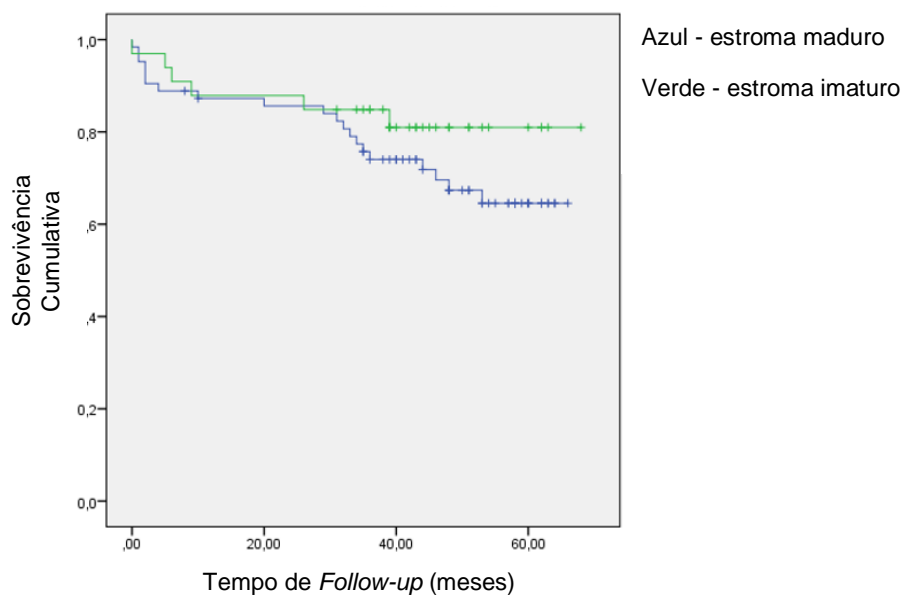


Figura 3 – Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o tipo de estroma tumoral

Tabela 6 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o tipo de estroma tumoral

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Maduro	51,7	2,9	46,0	57,3
Imaturo	58,0	3,8	50,5	65,4

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	1,4	1	0,245

Tabela 7 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o grau de inflamação

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Baixo Grau	48,0	3,6	41,0	55,0
Alto Grau	60,1	2,7	54,9	65,4

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	5,0	1	0,025

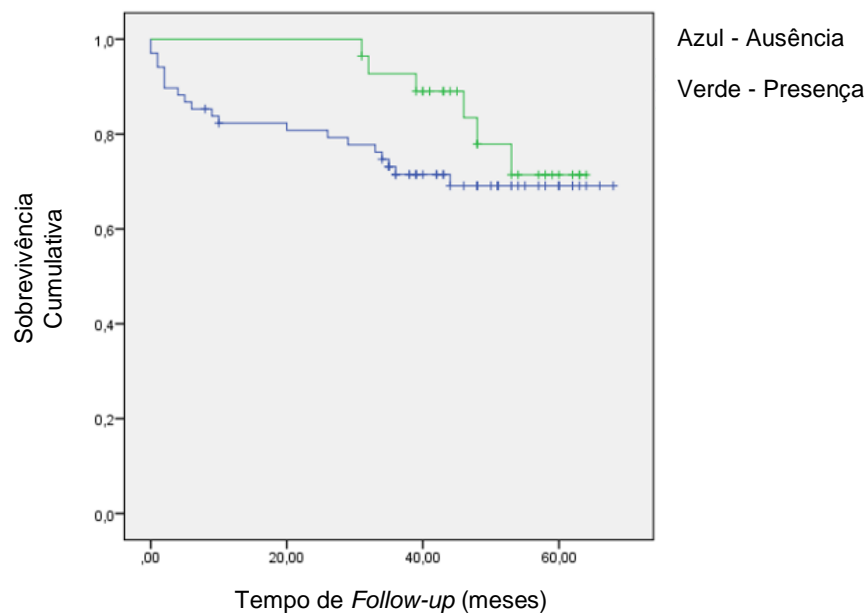


Figura 4 – Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com a presença de Tertiary lymphoid structures

Tabela 8 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com a presença de Tertiary lymphoid structures

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Ausente	52,0	3,1	45,8	58,1
Presente	58,1	2,1	53,9	62,3

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	1,3	1	0,262

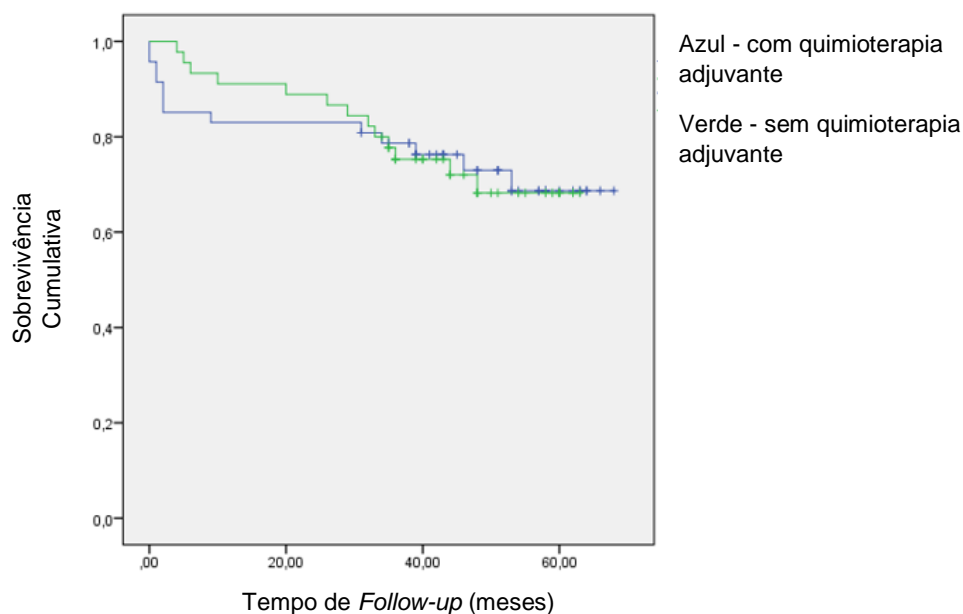


Figura 5 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal submetidos a quimioterapia adjuvante.

Tabela 9 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal submetidos a quimioterapia adjuvante

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Não	53,2	3,7	46,0	60,4
Sim	51,6	2,8	46,0	57,1

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	0,001	1	0,971

Tabela 10 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal de acordo com o estadiamento da American Joint Committee on Cancer.

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Estádio I	63,8	2,8	58,4	69,2
Estádio II	56,8	2,6	51,7	62,0
Estádio III	40,7	4,8	31,4	50,0
Estádio IV	53,3	7,9	37,9	68,8

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	15,376	3	0,002

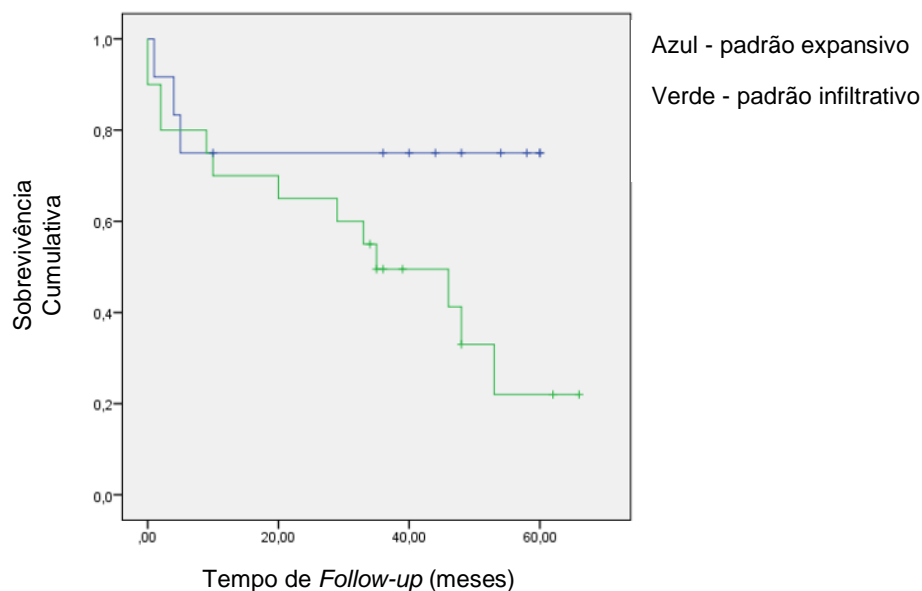


Figura 6 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o padrão de crescimento tumoral

Tabela 11 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o padrão de crescimento tumoral

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Padrão Expansivo	45,8	7,1	31,9	59,7
Padrão Infiltrativo	35,3	5,5	24,4	46,1

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	3,3	1	0,068

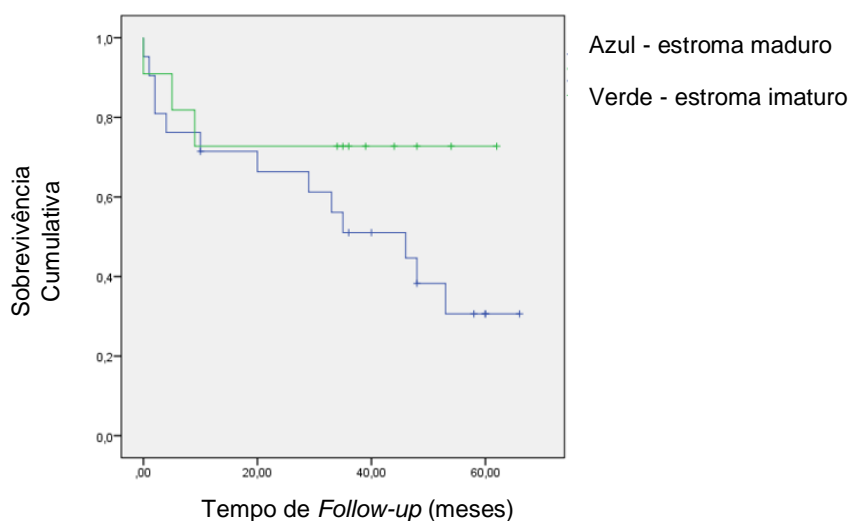


Figura 7 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o tipo de estroma tumoral.

Tabela 12 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o tipo de estroma tumoral

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Maduro	37,1	5,6	26,1	48,2
Imaturo	46,4	7,7	31,2	61,5

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	1,8	1	0,177

Tabela 13 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o grau de inflamação

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Baixo Grau	30,5	5,9	19,0	59,1
Alto Grau	53,3	4,9	4,9	62,9

	χ^2	df	Sig.
Log-Rank	6,5	1	0,011

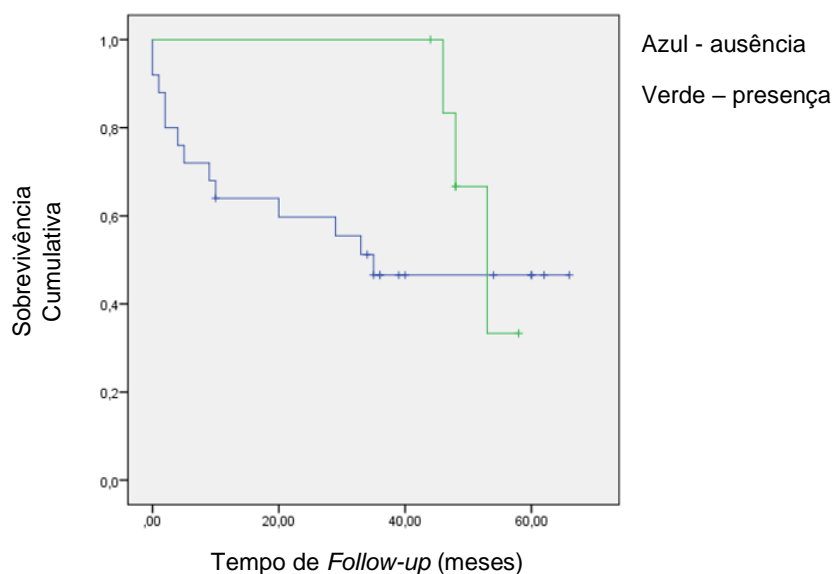


Figura 8 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com a presença de Tertiary lymphoid structures

Tabela 14 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com a presença de Tertiary lymphoid structures

	Média			
	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
			Valor Mínimo	Valor Máximo
Não	37,2	5,7	25,9	48,4
Sim	52,7	2,0	48,7	56,6

	X ²	df	Sig.
Log-Rank	1,2	1	0,274

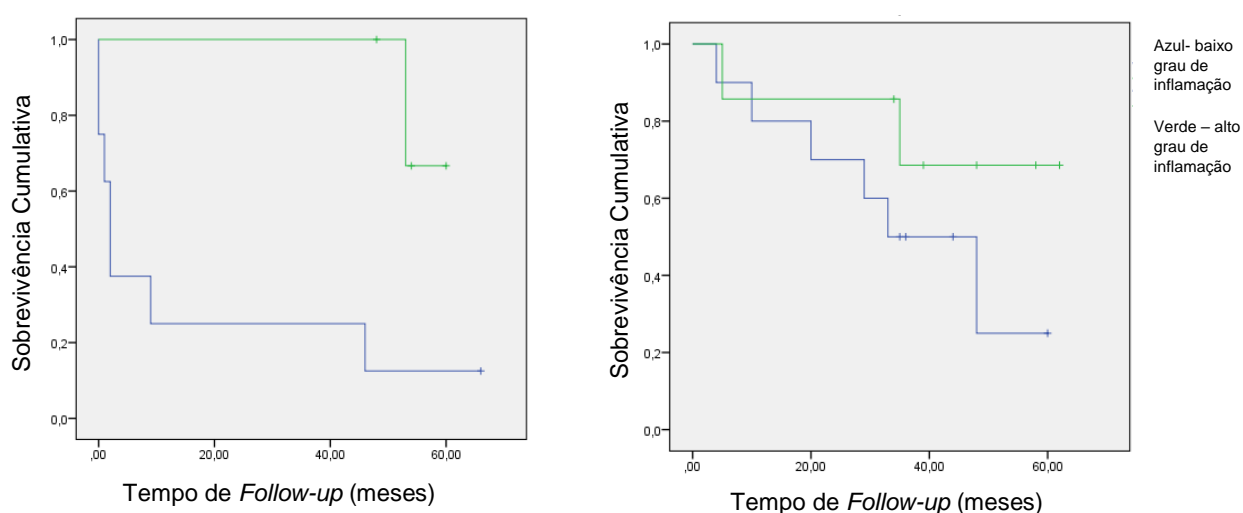


Figura 9 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o grau de inflamação submetidos a quimioterapia (direita) ou não (esquerda)

Tabela 15 - Sobrevivência de doentes operados por carcinoma colorretal em estágio III de acordo com o grau de inflamação submetidos a quimioterapia.

QTA		Média				
		Inflamação Simplificada	Estimada	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
					Valor Mínimo	Valor Máximo
Não	Baixo Grau	15,8	8,5	<0,001	32,3	
	Alto Grau	57,7	1,9	53,9	61,4	
Sim	Baixo Grau	36,6	6,4	24,1	49,1	
	Alto Grau	49,2	8,0	33,6	64,9	

QTA		X ²	df	Sig.
Log-Rank	Não	5,0	1	0,025
Log-Rank	Sim	1,5	1	0,214

Tabela 16 - Análise ROC Ratio gânglios metastizados/gânglios sem metástases

AUC	Desvio Padrão	Sig.
0,705	0.066	0.002

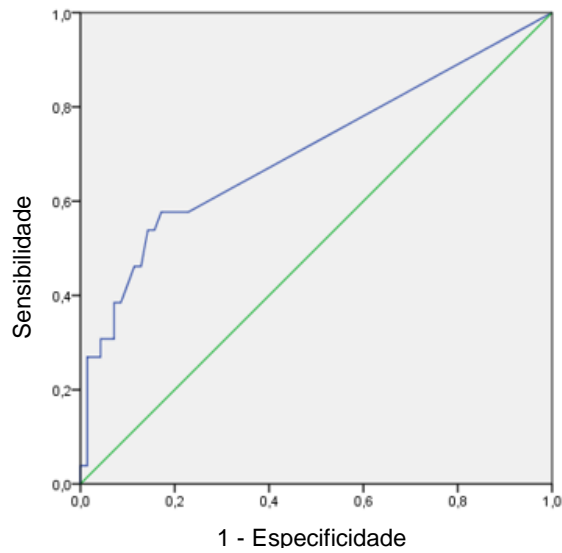


Figura 10 - Análise ROC Ratio gânglios metastizados/gânglios sem metástases

Tabela 17 - Análise ROC Número de gânglios metastizados

AUC	Desvio Padrão	Sig.
0,699	0.066	0.003

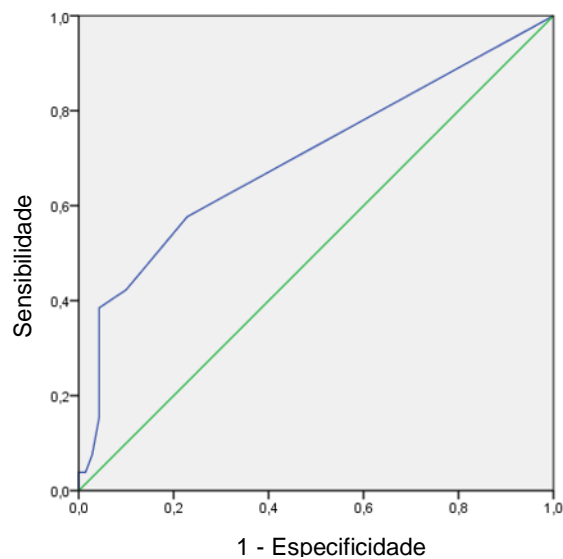


Figura 11 - Análise ROC Número de gânglios metastizados

Tabela 18 - Análise ROC Tamanho do tumor

AUC	Desvio Padrão	Sig.
0,561	0.072	0.362

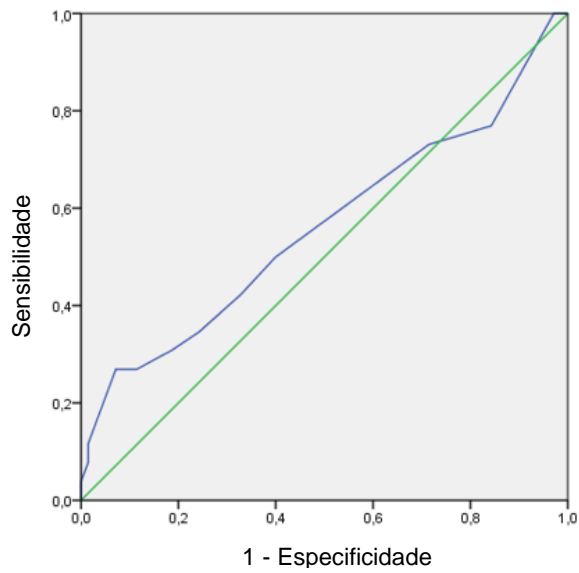


Figura 12 - Análise ROC Tamanho tumor

Tabela 19 - Análise ROC LODDS

AUC	Desvio Padrão	Sig.
0,460	0.093	0.680

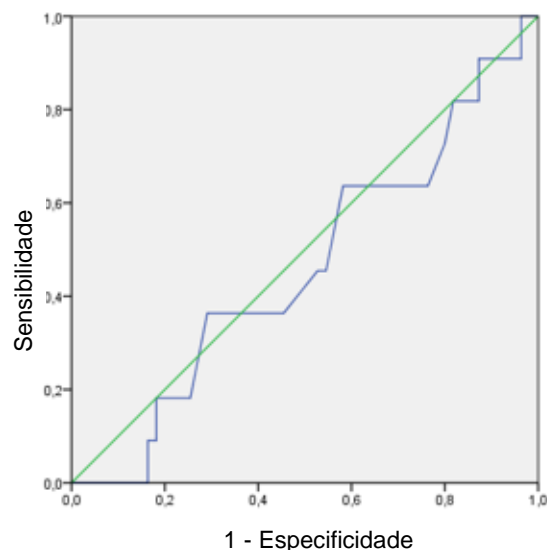


Figura 13 - Análise ROC LODDS

Tabela 20 - Análise ROC Estádio III Número de gânglios metastizados

AUC	Desvio Padrão	Sig.
0,640	0.104	0.185

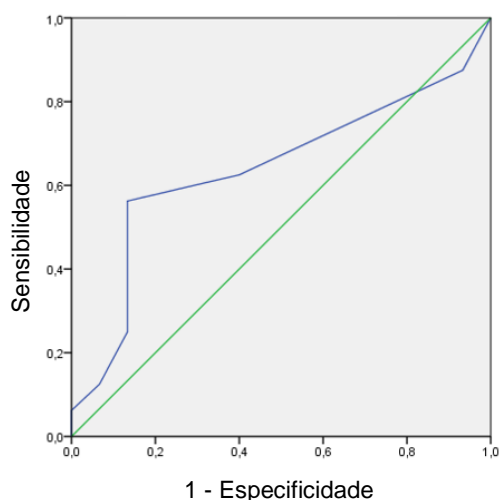


Figura 14 - Análise ROC Estádio III Número de gânglios metastizados

Tabela 21 - Análise ROC Estádio III Ratio gânglios metastizados/gânglios sem metastizados

AUC	Desvio Padrão	Sig.
0,673	0.099	0.101

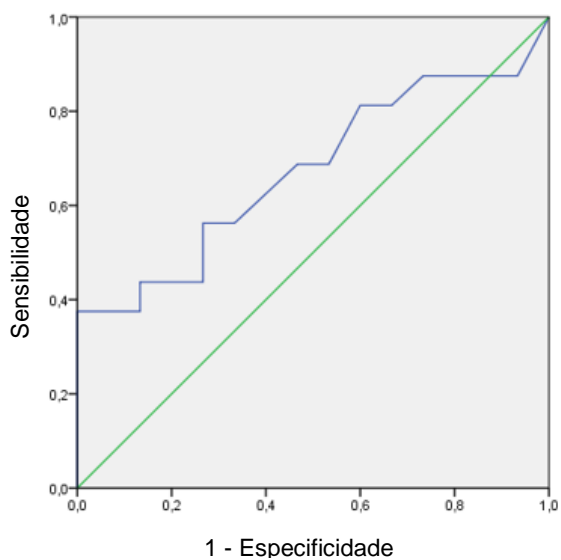


Figura 15 - Análise ROC Estádio III Ratio gânglios metastizados/gânglios sem metástases