

**Rute Maria Silva Salvador**

**Utilização de imunohistoquímica para  
avaliação da densidade linfática no  
mesentério de adenocarcinomas do cólon**

**Dissertação do Mestrado**

**Oncobiologia – Mecanismos Moleculares do Cancro**



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2018

**Rute Maria Silva Salvador**

**Utilização de imunohistoquímica para  
avaliação da densidade linfática no  
mesentério de adenocarcinomas do cólon**

**Mestrado em Oncobiologia –  
Mecanismos Moleculares do Cancro**

**Trabalho efetuado sob a orientação de:  
Professora Doutora Sofia Braga**

**E coorientação de:  
Professora Doutora Ana Teresa Maia**



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

2018

**Título do Trabalho:** “Utilização de imunohistoquímica para avaliação da densidade linfática no mesentério de adenocarcinomas do cólon”

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Os autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

**Assinatura do Autor:**

---

Rute Maria Silva Salvador

© **Copyright** Rute Maria Silva Salvador

“A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

## **Dedicatória**

Aos meus pais e ao meu irmão,  
Porque que me darem “asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar”.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Sofia Braga, por todo o apoio, por toda a paciência, por todos os ensinamentos transmitidos e, principalmente, por me ter acolhido e orientado da melhor forma possível neste projeto mesmo por entre toda a azáfama que preenche os seus dias.

Em segundo lugar, agradeço à Professora Doutora Ana Teresa Maia pela notável coorientação, pela preocupação e por todos os conhecimentos de Oncobiologia transmitidos.

Agradeço ao Doutor António Alves por toda a persistência comigo, pela disponibilidade e amabilidade e por toda a partilha de conhecimentos Anatomopatológicos tão uteis para a realização deste trabalho. Queria ainda reconhecer a gentileza e proficiência de todos os técnicos do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, em particular toda a ajuda e tolerância que a técnica Manuela Novo teve comigo.

Tenho ainda de agradecer, de uma forma muito especial, ao Doutor Ricardo Rocha. Todo o companheirismo e toda a dedicação foram fulcrais para que este projeto fluísse. Foste a minha maior ajuda neste trabalho, estiveste lá em todas as horas, todos os dias da semana e até nos fins de semana, mesmo não tendo a menor obrigação. É tão bom quando pessoas extraordinárias, bem-dispostas e positivas se cruzam na nossa vida e, sem menos esperarmos, nos dão a mão e nos levam por bons caminhos. Muito obrigado!

À Doutora Sílvia Coelho que, embora não contribuísse de forma direta para este trabalho, foi sem dúvida uma motivação extra neste ano da minha vida. Ajudou-me e fez-me crescer dando-me oportunidades para aprender a fazer mais e melhor.

Não posso deixar de agradecer o excelente acolhimento por parte de todos os elementos dos diferentes serviços do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca por onde passei. Um obrigado especial ao Doutor Victor Nunes e à Doutora Carla Carneiro pela minha excelente aceitação no serviço de Cirurgia, um obrigado ao Doutor Marco Ferreira e à Doutora Lucília Gonçalves do serviço de Anatomia Patológica pela receção, amabilidade e apoio para o desenvolvimento deste projeto e ainda um grande obrigado à Doutora Teresa Fiúza pela forma simpática como me recebeu no serviço de Oncologia.

Um agradecimento muito especial também a ti, Rafael, pela pessoa que és, pela infinita amizade, pelo imensurável carinho, por todo o amor e respeito e, acima de tudo, por toda a motivação para concluir esta dissertação. Obrigado por estares sempre ao meu lado!

E, como a conclusão deste mestrado é mais uma pequena conquista na minha vida, tenho de agradecer àqueles que desde sempre me acompanharam e que são os grandes pilares da minha vida. Não há palavras que possam descrever o que eu sinto por vós e o quanto vos estou eternamente grata. Porém, a ti, mano, meu pequeno grande amor, obrigado por todas as horas que me aturas, estando eu perto ou longe, e obrigado por me deixares, orgulhosamente, pertencer a cada pedacinho da tua vida. Aos meus pais, agradeço a presença incondicional. Obrigado por todo o apoio e por toda motivação quando eu mais precisava! Continuam, sem dúvida, a ser a minha grande fonte de inspiração.

## **RESUMO**

*Introdução:* O cancro colorretal apresenta-se como uma das neoplasias mais comuns nos países desenvolvidos. A sua capacidade de metastização ocorre por recurso a vasos sanguíneos e/ou linfáticos. Nas últimas décadas a importância da linfangiogénese no cancro tem sido discutida sendo que, desde que a técnica cirúrgica para a excisão total do mesorreto (ETM) demonstrou efeitos positivos nas recidivas locais do cancro do reto e, mais tarde, com a proposta da implementação da técnica cirúrgica da excisão completa do mesocólon (CME) para o cancro do cólon, a importância da manutenção da integridade do mesocólon e consequente rede linfática tem-se mantido em acesso debate. Até ao momento ainda não se conseguiu entender o verdadeiro benefício da manutenção da integridade da rede linfática e, como tal, a implementação rotineira da CME ainda não ocorreu.

*Objetivo:* Determinar, em doentes com adenocarcinoma do cólon, a densidade linfática mesentérica em regiões peritumorais e em regiões distais ao tumor e correlacionar a densidade linfática mesentérica com diferentes características clínico-patológicas e clínico-histológicas.

*Métodos:* Participaram neste estudo 49 doentes com adenocarcinoma do cólon de estadios T2 e T3. A avaliação da densidade linfática mesentérica foi realizada por imunohistoquímica com recurso ao anticorpo monoclonal D2-40 da podoplanina. Avaliou-se ainda a influência que diversas características clínico-patológicas e clínico-histológicas poderiam ter na densidade linfática mesentérica com recurso ao programa estatístico IBM SPSS.

*Resultados:* Verificou-se maiores densidades linfáticas na região peritumoral comparativamente às regiões distais ao tumor. A densidade linfática peritumoral não se relacionou positivamente com nenhuma das características clínico-patológicas e clínico-histológicas analisadas, no entanto, a densidade linfática distal ao tumor demonstrou significância estatística na relação com o índice de massa corporal, o número de gânglios positivos isolados, a profundidade de invasão do tumor e o envolvimento ganglionar.

*Conclusão:* O papel biológico dos vasos linfáticos na progressão tumoral continua controverso. Apenas se conseguiu correlacionar a densidade linfática com parâmetros clínico-patológicos e clínico-histológicos em regiões distais ao tumor o que reflete a

importância de uma técnica cirúrgica bem executada. Continuam a ser necessários mais estudos para a compreensão do papel da linfangiogênese na disseminação tumoral.

**Palavras-Chave:** Linfangiogênese, excisão completa do mesocólon, podoplanina, densidade linfática peritumoral, densidade linfática distal ao tumor.

## **ABSTRACT**

*Introduction:* Colorectal cancer presents itself as one of the most common neoplasms in developed countries. Their ability to metastasize occurs by resort to blood vessels and/or lymphatic vessels. In recent decades the importance of lymphangiogenesis in cancer has been discussed being that as long as the surgical technique for total mesorectal excision (TME) demonstrated positive effects on local recurrences of rectal cancer and, later, with the proposal for the implementation of complete mesocolic excision (CME) surgical technique for colon cancer, the importance of maintaining the integrity of the mesocolon and consequent lymphatic network it is being kept in intense debate. Until the moment has not yet been understood the true benefit of maintaining the integrity of the lymphatic network and, as such, the routine implementation of the CME has not yet occurred.

*Objective:* Determine, in patients with colon adenocarcinoma, the mesenteric lymphatic density in peritumoral regions and in distal regions to the tumor and correlate the lymphatic density mesenteric with different clinic-pathological and clinic-histological features.

*Methods:* Participated in this study 49 patients with adenocarcinoma of the colon with stages T2 and T3. The evaluation of mesenteric lymphatic density was carried out by immunohistochemistry using the antibody monoclonal D2-40 of podoplanin. It was also evaluated the influence that several clinic-pathological and clinic-histological features could have in mesenteric lymphatic density using the IBM SPSS statistical program.

*Results:* There were higher lymphatic densities in the peritumoral region compared to the distal regions of the tumor. The lymphatic peritumoral density was not positively related to any of the clinic-pathological and clinic-histological characteristics analyzed, however, the lymphatic density distal to the tumor demonstrated statistical significance in the relationship with the body mass index, the number of isolated positive lymph node, the depth of invasion of the tumor and the lymph node involvement.

*Conclusion:* The biological role of the lymph vessels in the tumor progression remains controversial. Only the lymphatic density was correlated with the clinic-pathological and clinic-histological parameters in distal regions to the tumor which reflects the importance

of a well-executed surgical technique. Further studies are still needed to understand the role of the lymphangiogenesis in the tumor dissemination.

**Keywords:** Lymphangiogenesis, complete excision of the mesocolon, podoplanin, peritumoral lymphatic density, lymphatic density distal to the tumor.

## **Índice**

Dedicatória.....	iii
Agradecimentos .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas.....	xv
Índice de Anexos.....	xviii
Lista de Abreviaturas.....	xix
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Cancro.....	1
1.2 O papel do Sistema Imunitário no Cancro.....	4
1.3 Cancro Colorretal.....	5
1.3.1 Epidemiologia.....	7
1.3.2 Fatores de Risco .....	8
1.3.3 Sintomatologia.....	9
1.3.4 Anatomia .....	9
1.4 Estadiamento Tumoral.....	11
1.4.1 Sobrevida segundo o estadio no momento de diagnóstico.....	13
1.5 <i>Budding</i> Tumoral .....	13
1.6 Grau Histológico Tumoral .....	14
1.7 Tipo Histológico Tumoral .....	15
1.8 Tratamento do Cancro Colorretal .....	15
1.8.1 Técnica Cirúrgica: Excisão Completa do Mesocólon .....	16
1.9 Angiogénese e Linfangiogénese .....	17
1.9.1 Disseminação Tumoral: Via Hematogénica e Via Linfática.....	18
1.10 A importância da linfangiologia no Cancro Colorretal .....	19

2.	HIPÓTESE E OBJETIVOS .....	21
2.1	Hipótese .....	21
2.2	Objetivos.....	21
3.	MÉTODOS.....	22
3.1	Colheita de Amostras .....	22
3.2	Macroscopia das peças cirúrgicas .....	22
3.3	Identificação dos espécimes cirúrgicos através dos mapeamentos da Anatomia Patológica.....	23
3.4	Coloração Hematoxilina e Eosina (HE).....	24
3.5	Microtomia.....	24
3.6	Imunohistoquímica (IHQ).....	25
3.6.1	Imunohistoquímica realizada em sistema automático Leica BOND-III ..	26
3.6.2	Protocolo Imunohistoquímico .....	27
3.6.3	Montagem das lâminas de Imunohistoquímica .....	29
3.7	Revisão das lâminas de IHQ .....	29
3.8	Avaliação dos Vasos Linfáticos.....	30
3.9	Parâmetros Clínico-Patológicos e Clínico-Histológicos.....	30
3.10	Análise Estatística.....	31
4.	RESULTADOS .....	32
4.1	Análise das características Clínico-Patológicas.....	32
4.2	Imunohistoquímica .....	33
4.2.1	Controlo Tecidual.....	33
4.2.2	Densidade Linfática nos adenocarcinomas do cólon.....	33
4.2.2.1	Densidade Linfática nas secções mesentéricas peritumorais .....	34
4.2.2.2	Densidade Linfática nas secções mesentéricas distais ao tumor .....	39
4.3	Análise das caraterísticas clínico-histológicas.....	41
4.4	Análise estatística da densidade linfática.....	44

4.4.1	Análise da influência das diferentes variáveis de estudo na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon .....	44
4.4.1.1	Influência da variável “gênero” na densidade linfática.....	44
4.4.1.2	Influência da variável “Índice de Massa Corporal (IMC)” na densidade linfática .....	47
4.4.1.3	Influência da variável “idade” na densidade linfática .....	48
4.4.1.4	Influência da variável “estadiamento pTNM” na densidade linfática.....	49
4.4.1.5	Influência da variável “invasão perineural” na densidade linfática .....	59
4.4.1.6	Influência da variável “invasão linfovascular” na densidade linfática.....	59
4.4.1.7	Influência da variável “tamanho do tumor” na densidade linfática.....	62
4.4.1.8	Influência da variável “perímetro ocupado pelo tumor” na densidade linfática .....	63
4.4.1.9	Influência da variável “padrão mucinoso” na densidade linfática .....	65
4.4.1.10	Influência da variável “ <i>budding</i> tumoral” na densidade linfática .....	65
4.4.1.11	Influência da variável “manutenção da integridade do mesocólon” na densidade linfática.....	69
4.4.1.12	Influência da variável “grau de diferenciação tumoral” na densidade linfática .....	69
4.4.1.13	Influência da variável “tipo de intervenção cirúrgica” na densidade linfática .....	72
4.4.1.14	Influência da variável “localização do tumor” na densidade linfática..	73
4.4.1.15	Influência da variável “infiltração linfocítica peritumoral” na densidade linfática .....	74
4.4.1.16	Influência da variável “infiltração linfocítica intratumoral” na densidade linfática .....	74
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÃO .....	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85
8	ANEXOS.....	xx

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Hallmarks of Cancer. ....	2
<b>Figura 1.2</b> - Processo de evolução tumoral. ....	3
<b>Figura 1.3</b> - Patogénese do cancro colorretal. ....	5
<b>Figura 1.4</b> - Alterações genéticas que levam à progressão do cancro colorretal.....	6
<b>Figura 1.5</b> - Incidência e Mortalidade do cancro colorretal a nível mundial. ....	7
<b>Figura 1.6</b> - Anatomia do intestino grosso .....	10
<b>Figura 1.7</b> - Ilustração esquemática da relação entre o mesocólon e a fáscia de Toldt..	11
<b>Figura 1.8</b> - Vias de disseminação tumoral. Via hematogénica e via linfática. ....	18
<b>Figura 3.1</b> - Mapeamento de um adenocarcinoma do cólon realizado no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca. ....	23
<b>Figura 3.2</b> - Ligação antigénio-anticorpo. ....	25
<b>Figura 3.3</b> - Método direto e método indireto de imunohistoquímica.....	26
<b>Figura 3.4</b> - Equipamento automatizado de imunohistoquímica BOND- III da Leica..	27
<b>Figura 4.1</b> - Controlo tecidular de amígdala utilizado na imunohistoquímica. (IHQ, ampliação 10x) .....	33
<b>Figura 4.2</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina realizada em regiões peritumorais (A) e em regiões distais ao tumor (B). (IHQ, ampliação 10x).....	34
<b>Figura 4.3</b> - Lâmina corada com hematoxilina-eosina do serviço de Anatomia patológica do Hospital Fernando Fonseca. ....	35
<b>Figura 4.4</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon do género masculino (A) e caso de adenocarcinoma do cólon do género feminino (B). (IHQ, ampliação 10x). ....	35
<b>Figura 4.5</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon em estadio pT2 (A) e caso de adenocarcinoma do cólon em estadio pT3 (B). (IHQ, ampliação 10x).....	36
<b>Figura 4.6</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon com índice de massa corporal <25 (A) e caso de adenocarcinoma com índice de massa corporal $\geq 25$ (B). (IHQ, ampliação 10x).....	37
<b>Figura 4.7</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon com idade inferior a 60 anos. (IHQ, ampliação 10x). ....	38

<b>Figura 4.8</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon com marcação incomum. (IHQ, ampliação 10x).....	38
<b>Figura 4.9</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon, região distal ao tumor, do género masculino (A) e caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, do género feminino (B). (IHQ, ampliação 10x).....	39
<b>Figura 4.10</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon, em região distal ao tumor, estadio pT2, com pouca marcação de vasos linfáticos (A); caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, em estadio pT3 (B); caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, em estadio pT2 com maior marcação de vasos linfáticos (C). (IHQ, ampliação 10x).....	40
<b>Figura 4.11</b> - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon, em região distal ao tumor, com idade inferior a 50 anos (A) e caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, com idade superior a 80 anos. (IHQ, ampliação 10x). ....	41
<b>Figura 4.12</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o género feminino/masculino. ....	45
<b>Figura 4.13</b> - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o IMC. ....	47
<b>Figura 4.14</b> - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a variável idade.....	48
<b>Figura 4.15</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o grau de invasão à parede (pT). ....	51
<b>Figura 4.16</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o envolvimento de gânglios linfáticos (pN). ....	53
<b>Figura 4.17</b> - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o número de gânglios isolados por tumor. ....	54

<b>Figura 4.18</b> - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o número de gânglios isolados e positivos por tumor. ....	56
<b>Figura 4.19</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença ou ausência de metástases à distância (pM). ....	57
<b>Figura 4.20</b> - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o tamanho do tumor.....	63
<b>Figura 4.21</b> - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o perímetro ocupado pelo tumor. ....	64
<b>Figura 4.22</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença ou ausência de budding tumoral e o número de gânglios linfáticos isolados positivos.....	67
<b>Figura 4.23</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o grau de diferenciação do tumor. ....	71
<b>Figura 4.24</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o tipo de intervenção cirúrgica realizada.....	72
<b>Figura 4.25</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a localização anatômica do tumor. ....	73
<b>Figura 4.26</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença e tipo de infiltração linfocítica peritumoral. ....	75
<b>Figura 4.27</b> - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm <sup>2</sup> , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença e tipo de infiltração linfocítica intratumoral. ....	76

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1.1</b> - Classificação de Duke's. ....	12
<b>Tabela 1.2</b> - Estádios do cancro colorretal e correspondente taxa de sobrevivência.....	13
<b>Tabela 1.3</b> - Grau histológico tumoral. ....	14
<b>Tabela 3.1</b> - Condições otimizadas e anticorpo primário utilizado neste estudo. ....	28
<b>Tabela 4.1</b> - Características clínico-patológicas dos 49 casos de adenocarcinoma do cólon. ....	32
<b>Tabela 4.2</b> - Análise estatística do tamanho do tumor na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon.....	42
<b>Tabela 4.3</b> - Análise estatística do perímetro ocupado pelo tumor na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon.....	42
<b>Tabela 4.4</b> - Análise estatística do número de gânglios linfáticos isolados e do número de gânglios linfáticos positivos na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon. .	42
<b>Tabela 4.5</b> - Análise estatística de diversas características clínico-histológicas: estadio pTNM, invasões e infiltrações tumorais, grau de diferenciação tumoral, presença de padrão mucinoso, presença de budding tumoral e integridade do mesocólon. ....	43
<b>Tabela 4.6</b> - Análise estatística da densidade linfática peritumoral Vs densidade linfática distal ao tumor. ....	44
<b>Tabela 4.7</b> - Significância estatística entre a densidade linfática peritumoral e a densidade linfática distal ao tumor em adenocarcinomas do cólon.....	44
<b>Tabela 4.8</b> - Análise estatística da variável género na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	46
<b>Tabela 4.9</b> - Significância estatística da variável género na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	46
<b>Tabela 4.10</b> - Significância estatística da variável IMC na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	47
<b>Tabela 4.11</b> - Significância estatística da variável idade na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	48
<b>Tabela 4.12</b> - Análise estatística da variável estadiamento pT na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	50
<b>Tabela 4.13</b> - Significância estatística da variável estadiamento pT na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	50

<b>Tabela 4.14</b> - Análise estatística da variável estadiamento pN na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	51
<b>Tabela 4.15</b> - Significância estatística da variável estadiamento pN na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	52
<b>Tabela 4.16</b> - Significância estatística da variável quantidade de gânglios linfáticos isolados na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	54
<b>Tabela 4.17</b> - Significância estatística da variável quantidade de gânglios linfáticos isolados e positivos na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	55
<b>Tabela 4.18</b> - Análise estatística da variável estadiamento pM na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	57
<b>Tabela 4.19</b> - Significância estatística da variável estadiamento pM na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	58
<b>Tabela 4.20</b> - Análise estatística da variável invasão perineural na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	59
<b>Tabela 4.21</b> - Significância estatística da variável invasão perineural na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	60
<b>Tabela 4.22</b> - Significância estatística da variável invasão linfovascular na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon .....	61
<b>Tabela 4.23</b> - Análise estatística da variável invasão linfovascular na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	62
<b>Tabela 4.24</b> - Significância estatística da variável tamanho do tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	62
<b>Tabela 4.25</b> - Significância estatística da variável perímetro ocupado pelo tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	64
<b>Tabela 4.26</b> - Análise estatística da variável padrão mucinoso na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	65

<b>Tabela 4.27</b> - Significância estatística da variável padrão mucinoso na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	66
<b>Tabela 4.28</b> - Análise estatística da variável presença de budding tumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	67
<b>Tabela 4.29</b> - Significância estatística da variável presença de budding tumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	68
<b>Tabela 4.30</b> - Análise estatística da variável integridade do mesocólon na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	69
<b>Tabela 4.31</b> - Significância estatística da variável integridade do mesocólon na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	70
<b>Tabela 4.32</b> - Significância estatística da variável grau de diferenciação do tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	71
<b>Tabela 4.33</b> - Significância estatística da variável tipo de intervenção cirúrgica realizada na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	72
<b>Tabela 4.34</b> - Significância estatística da variável localização do tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon. ....	73
<b>Tabela 4.35</b> - Significância estatística da variável infiltração linfocítica peritumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	74
<b>Tabela 4.36</b> - Significância estatística da variável infiltração linfocítica intratumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.....	74

## **Índice de Anexos**

Anexo I – Estadiamento do Cancro Colorretal .....	xx
Anexo II – Protocolo de Macroscopia .....	xxi
Anexo III – Protocolo de Coloração Hematoxilina e Eosina.....	xxii
Anexo IV - Protocolo de Imunohistoquímica (BOND-III Leica <i>Biosystems</i> ).....	xxiii

## **Lista de Abreviaturas**

- ADC – Adenocarcinoma
- AJCC – *American Joint Committee on Cancer*
- BT – *Budding* Tumoral
- CCHNP – Cancro Colorretal hereditário não polipóide
- CCR – Cancro Colorretal
- CD – Células Dendríticas
- CME – *Complete Mesocolic Excision*
- DAB – *Diaminobenzidine tetrahydrochloride*
- DGS – Direção Geral de Saúde
- EDTA – Ácido Etilenodiamino tetra-acético
- EMT – Transição epitélio-mesenquima
- ER2 – *Bond Epitope Retrieval 2*
- ETM – Excisão Total do Mesorreto
- HE – Hematoxilina e Eosina
- HFF – Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca
- HIS – Hibridização *in situ*
- IHQ – Imunohistoquímica
- IMC – Índice de Massa Corporal
- LOH – Perda de heterozigotia
- NK – Células Natural *Killer*
- PAF – Polipose Adenomatosa Familiar
- SAP – Serviço de Anatomia Patológica
- TME – *Total Mesorectal Excision*
- TNM – *Tumor Node Metastasis*
- UICC – *Union for International Cancer Control*

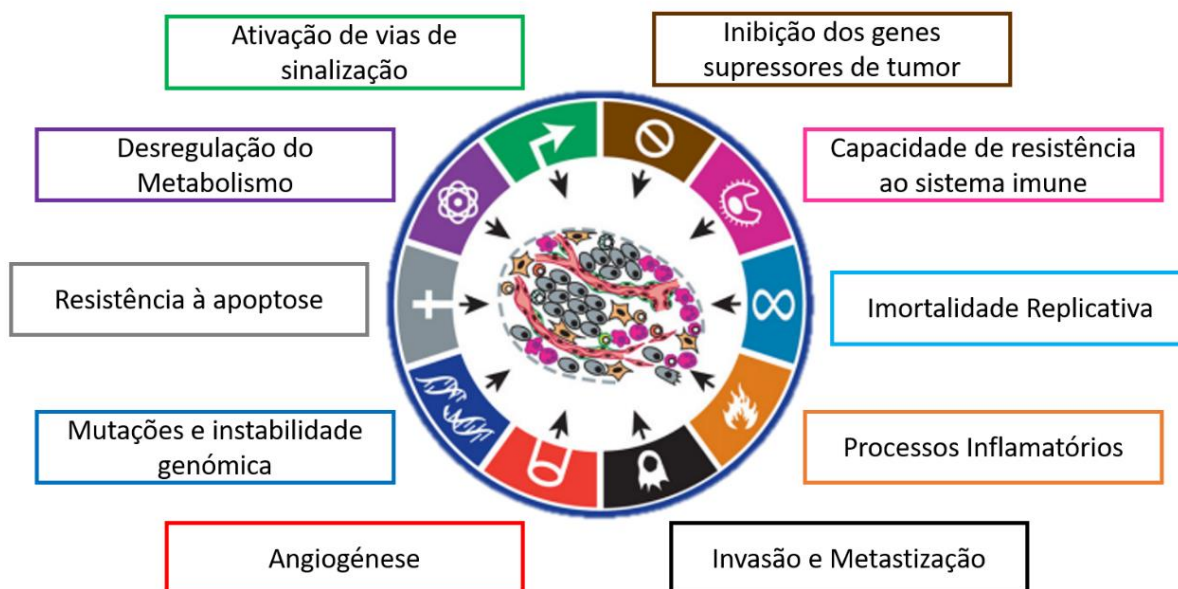
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Cancro

O organismo humano é composto por tecidos e órgãos sendo que, estes, por sua vez, são constituídos por células e produtos celulares que derivam da divisão de células preexistentes. De forma a assegurar a manutenção dos tecidos ao longo da vida de um indivíduo, muitas células, mantêm a capacidade de crescer e de se dividir mesmo após o desenvolvimento do organismo estar completo. Estas características que as células de um organismo ostentam podem representar uma ambiguidade de papeis, por um lado traduzem-se em autonomia e polivalência por outro podem refletir risco, uma vez que as células podem obter acesso a informações contidas no genoma que normalmente lhes são recusadas e assumir papéis inadequados levando ao desenvolvimento do tumor (1).

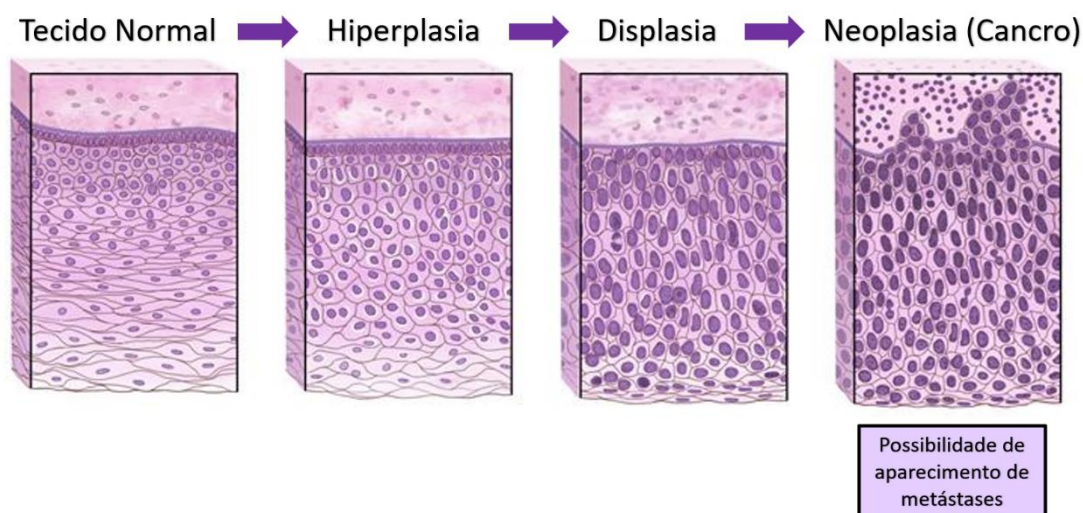
De facto, os tumores, tal como os tecidos normais, são compostos por massas de células que aprenderam a ultrapassar os mecanismos extraordinários que os organismos possuem para impedir o seu aparecimento. Uma célula neoplásica pode migrar desde o seu tecido de origem e invadir outras localizações anatómicas uma vez que não respeita as instruções que lhe são atribuídas pelo seu microambiente. Assim, é possível classificar os tumores em dois tipos: quando um tumor cresce localmente, não apresenta capacidade de metastização e não invade os tecidos adjacentes é classificado como benigno. Porém, por outro lado, quando invade os tecidos próximos e gera metástases (isto é, quando apresenta a capacidade de se mover dentro dos limites do corpo humano, afastar-se do local anatómico de origem da doença e invadir outras localizações estabelecendo novas colónias de células cancerígenas) são denominados de tumores malignos (1).

As células cancerígenas vão sofrendo ao longo do tempo, de forma progressiva, a acumulação de mutações que lhes afetam a proliferação (2) levando-lhes a fazer cada vez mais cópias de si próprias (1) e conferindo-lhes um comportamento maligno (2). Este processo de transformação de células normais em células cancerígenas é extraordinariamente complexo, no entanto pode ser resumido segundo os *Hallmarks of Cancer* (figura 1.1) (3,4).



**Figura 1.1 - Hallmarks of Cancer.** #1 Ativação de vias de sinalização: as células cancerígenas são capazes de desregular os sinais que mantêm a homeostase de uma célula normal; #2 Inibição dos genes supressores de tumor: as células cancerígenas têm capacidade de invadir os programas celulares que regulam negativamente a proliferação celular das células normais impedindo a sua atuação e levando assim a um crescimento descontrolado; #3 Resistência ao sistema imune: uma vez que, o sistema imune é responsável por reconhecer e eliminar células tumorais, estas mesmas células criam mecanismos para superá-lo; #4 Imortalidade replicativa: ao contrário das células normais que têm capacidade finita de divisão devido ao processo de encurtamento dos telómeros, as células cancerígenas criam mutações que ativam a telomerase e levam à sua imortalização; #5 Processos inflamatórios: a maioria das células cancerígenas possuem infiltrados de células imunes que libertam espécies reativas de oxigénio (químicos) que as vão auxiliar na sua proliferação; #6 Invasão e metastização: Uma das características que mais define os tumores é a sua malignidade sendo que, para tal, é necessário que as células cancerígenas tenham capacidade de invadir os tecidos adjacentes e originar metástases em locais distantes; #7 Angiogénese: Caracteriza-se pelo facto dos tumores malignos desenvolverem mecanismos para a criação, expansão ou remodelação de vasos sanguíneos de forma a garantirem o fornecimento de nutrientes essenciais para um crescimento mais acelerado; #8 Mutações e instabilidade genómica: alterações no genoma das células normais causadas por agentes mutagénicos pode conduzir a erros na maquinaria de reparação do DNA contribuindo assim para a proliferação de células cancerígenas; #9 Resistência à apoptose: As células cancerígenas são capazes de superar os mecanismos de resposta à morte apoptótica existentes nas células normais; #10 Desregulação do metabolismo: Enquanto as células normais degradam glucose para obtenção de energia através de um processo denominado glicólise anaeróbia as células tumorais degradam glucose na presença de oxigénio. Adaptado de “Hallmarks of Cancer: The Next Generation” (3).

De facto, as células normais evoluem para células com fenótipos cada vez mais neoplásicos através de um processo de múltiplas etapas: tecido normal → hiperplasia → displasia → neoplasia → metástase, denominado de progressão tumoral (figura 1.2) (1). O processo de progressão tumoral acontece devido a uma sequência de mutações e alterações epigenéticas que ocorrem de um modo aleatório. A passagem de tecido normal para tecido hiperplásico caracteriza-se pelo aumento da proliferação celular e consequente aumento do número de células. Na displasia, o tecido toma uma aparência desordenada, ocorre o aumento de células imaturas e surgem mudanças morfológicas ou funcionais que podem predispor ao aparecimento de cancro. A neoplasia descreve um cenário de tecido tumoral, ou seja, quando ocorre uma neoplasia está subentendida uma perda progressiva dos controlos que limitam a divisão celular levando, portanto, a uma proliferação descontrolada e ao aparecimento de tumor benigno ou maligno com a possibilidade do surgimento de metástases (5).



**Figura 1.2** - Processo de evolução tumoral. Para que uma célula normal se torne cancerígena ela passa por modificações (hiperplasia e displasia). Adaptado de Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration.

Apesar de ter sido Hipócrates, o pai da medicina (460-370 a.C.), a descrever pela primeira vez o cancro, (6) tem sido ao longo dos últimos anos, que a incidência desta doença na população tem vindo a prosperar, principalmente devido ao aumento da esperança média de vida e à maior exposição a agentes cancerígenos como a radiação, o tabaco e agentes químicos (7). De facto, atualmente, o cancro constitui um enorme problema de saúde a nível mundial sendo que, segundo a *American Cancer Society*, em

2030, espera-se o aparecimento de cerca de 21,4 milhões de novos casos e cerca de 13,2 milhões de mortes associadas a esta doença (8). Como tal, torna-se cada vez mais emergente a continuação de agregação de esforços na ciência para compreender melhor o cancro, uma das patologias que tem maior impacto na mortalidade no mundo.

## **1.2 O papel do Sistema Imunitário no Cancro**

É atualmente conhecido que, aproximadamente 70% das células que constituem o sistema imunitário do organismo humano se encontram localizadas no intestino (9). O sistema imunitário é constituído por diferentes órgãos e tecidos podendo ser dividido em dois grandes sistemas, um constituído por uma componente menos específica, a imunidade inata, e um outro formado por uma componente mais complexa, a imunidade adquirida ou adaptativa (10).

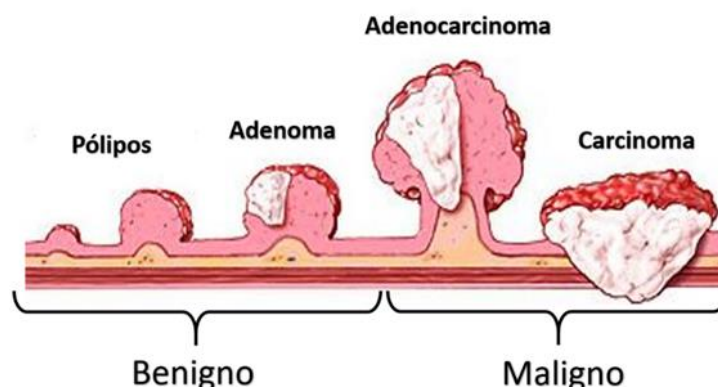
O sistema imunitário desempenha um papel complexo e multifacetado no que respeita ao cancro, detendo funções anticancerígenas e facilitando o tratamento, mas também conferindo vantagens para a carcinogénese. Assim, as células imunitárias podem intervir tanto como supressores da iniciação e progressão do tumor, como promotores da proliferação, infiltração e metástase (11). Tanto a componente inata (macrófagos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas (CD), células mieloides derivadas de células supressoras e células natural *killer* (NK)) como a componente adaptativa (linfócitos T e B) do sistema imunitário fazem parte do microambiente tumoral que é caracterizado por uma rede complexa de células do estroma, células inflamatórias e células imunitárias (12).

Desta interação dupla que ocorre entre as células tumorais e o sistema imunológico surgiu o conceito de *cancer immunoediting*. Este conceito define as ações que promovem tanto a formação como a proteção contra o aparecimento de tumores (12). Este processo engloba 3 fases, a primeira é a fase de eliminação, onde atuam mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida e onde ocorre a identificação e a destruição das células tumorais primordiais (12,13). No entanto, caso não ocorra a eliminação completa das células tumorais, atinge-se a segunda fase, a fase de equilíbrio, na qual a imunidade adaptativa controla o crescimento de células tumorais clinicamente indetetáveis (12) Por fim, as células malignas com reduzida imunogenicidade iniciam a fase de escape, a terceira fase, caracterizada pela evasão e progressão tumoral (12,14).

Assim, conclui-se que o sistema imunológico, tanto o inato como o adquirido, interage com o tumor podendo contribuir para o seu crescimento ou para a sua inibição e/ou eliminação. Para além disso, o conceito de *cancer immunoediting* tem sido avançado como um dos papéis assumidos pelo mesentério no contexto da neoplasia do cólon. Com efeito, teoriza-se que o mesentério, enquanto órgão essencialmente imunológico, conferirá ao tumor um papel protetor, sendo a sua excisão completa uma forma de atingir uma maior probabilidade de cura.

### 1.3 Cancro Colorretal

O cancro colorretal (CCR), resulta de uma combinação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, (15) sendo que, independentemente da sua etiologia, origina-se, na sua maioria, de pólipos. Um pólipo é uma protusão macroscópica visível na superfície da mucosa. Há diferentes tipos de pólipos, desde o pólipo hiperplásico até ao pólipo adenomatoso e apenas estes últimos são claramente pré-malignos e podem vir a transformar-se em tecido cancerígeno (16). De facto, o CCR desenvolve-se de forma lenta ao longo dos anos, sendo necessário um processo de múltiplas etapas para que a mucosa normal se transforme num carcinoma invasivo e potencialmente fatal (16,17). Porém, como já foi referido, inicialmente, o CCR manifesta-se pela presença de pólipos que, posteriormente, evoluem para adenomas e finalmente para carcinomas com potencial para invasão e metástase (figura 1.3) (17). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento de pólipos incluem o consumo excessivo de álcool ou tabaco, a idade, a obesidade e condições inflamatórias crónicas tais como as doenças inflamatórias do intestino (15).

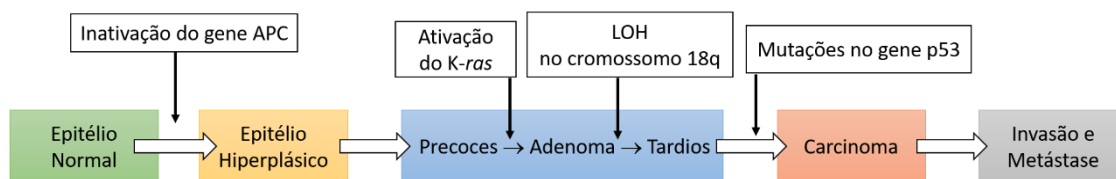


**Figura 1.3** - Patogénese do cancro colorretal. Os pólipos do cólon são benignos e de dimensão variada. Desde a passagem de um pólipo até ao carcinoma há um processo longo de anos/décadas daí que a prevenção seja importante. Adaptado de John Hopkins Medicine Colorectal Cancer.

Até ao aparecimento do cancro colorretal propriamente dito, é necessário que ocorra uma sequência específica de alterações genéticas (figura 1.4) nomeadamente, a inativação do gene APC no cromossoma 5q (que ocorre em aproximadamente 80% dos carcinomas do cólon), seguindo-se de mutações no *k-ras*, sucedendo-se a perda de heterozigotia (LOH) no cromossomo 18q que afeta genes supressores de tumor e por fim, mutações no p53 (1).

De facto, mutações que afetam os genes supressores de tumor assim como outros genes essenciais na regulação do ciclo celular, designadamente, os proto-oncogenes ou os genes que regulam a apoptose podem levar ao aparecimento de CCR. Os genes supressores de tumores estão envolvidos no controlo do crescimento e divisão celular, portanto, quando ocorrem alterações nestes genes que promovam a sua inativação pode ocorrer uma divisão descontrolada de células. De forma semelhante, se os proto-oncogenes sofrerem mutações que levem a que a sua ação no crescimento das células seja exacerbada estes facilmente se transformam em oncogenes, estimulando assim, o crescimento e a sobrevivência das células, mesmo quando estas deviam sofrer apoptose e ser eliminadas pelo sistema imunitário. Por outro lado, alterações nos genes reguladores da apoptose, que são genes que estão envolvidos na morte celular programada, promovem a continuação da divisão de células imperfeitas o que facilmente impulsiona o aparecimento de neoplasias (5).

Estas mutações que ocorrem nas células podem então resultar em carcinogénese, isto é, na transformação de células normais em células cancerígenas (5). Durante a carcinogénese as células tumorais interagem com um microambiente complexo composto por matriz extracelular e células hospedeiras não neoplásicas, incluindo células inflamatórias, células mesenquimais, células endoteliais vasculares e células imunitárias. É esta diversidade de células que garante ao tumor o aporte de fatores de crescimento, nutrientes, oxigénio, citocinas e outros mediadores químicos de forma a sustentar a sua sobrevivência, invasão e metástase (18).

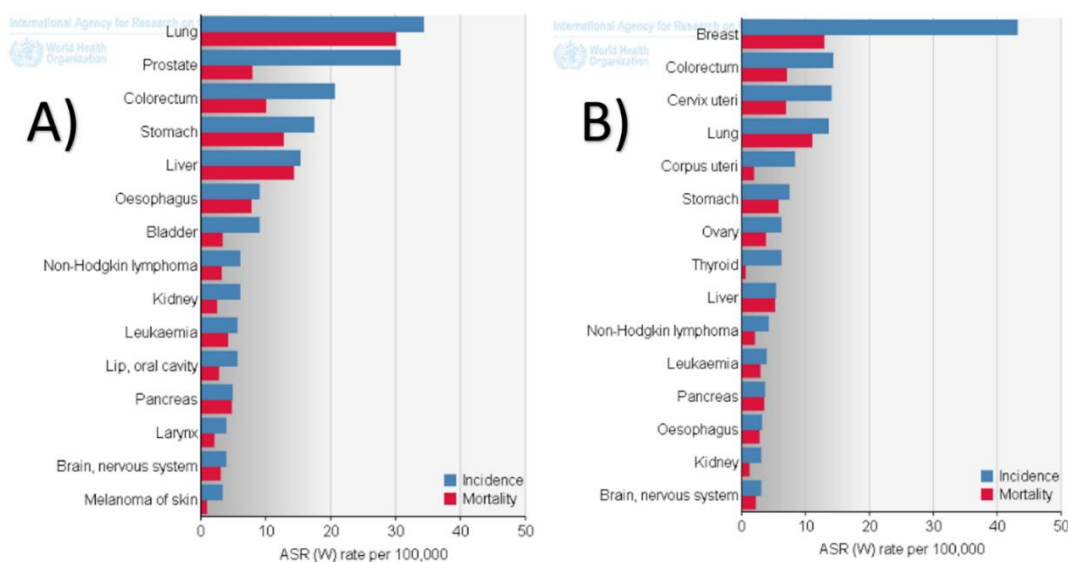


**Figura 1.4** - Alterações genéticas que levam à progressão do cancro colorretal. À medida que o cancro colorretal se desenvolve no sentido da malignidade ocorre uma sucessão de alterações genéticas nas células do epitélio do cólon. Adaptado de “The biology of cancer.” (1).

### 1.3.1 Epidemiologia

O cancro colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais comuns nos países desenvolvidos (19). Segundo o relatório da GLOBOCAN de 2012, na Europa, nesse ano, existiram 471 mil novos casos desta patologia sendo que 228 mil pessoas morreram dela (20). O CCR é pouco frequente em indivíduos com menos de 50 anos, sendo os 70 anos a idade média de diagnóstico desta doença. Afeta ambos os sexos de forma semelhante, embora seja, ligeiramente, mais frequente nos homens. A incidência da doença tem-se, no entanto, mantido idêntica nos últimos 30 anos (16). A nível mundial, o CCR é o terceiro tipo de cancro mais comum em homens e o segundo mais comum em mulheres (figura 1.5) (20).

Segundo dados da Direção Geral da Saúde (DGS) de 2016, o CCR representa o segundo tipo de cancro mais mortífero em Portugal (21). É importante notar que o prognóstico desta doença se encontra fortemente relacionado com a fase de diagnóstico, uma vez que, as taxas relativas de sobrevivência aos cinco anos correspondem a cerca de 90% para doença localizada em comparação com 13% quando existem metástases no momento do diagnóstico (22).



**Figura 1.5** - Incidência e Mortalidade do cancro colorretal a nível mundial. O cancro colorretal é o terceiro tipo de cancro mais comum em homens (A) e o segundo mais comum em mulheres (B). A incidência e a mortalidade desta doença são semelhantes em homens e mulheres embora seja ligeiramente maior nos homens. Adaptado de (20).

### **1.3.2 Fatores de Risco**

Quando se refere, em saúde, um fator de risco, tenciona-se mencionar que um determinado fator aumenta a probabilidade de se poder vir a padecer de uma doença, nomeadamente, um cancro. Existem alguns fatores de risco que podem ser controlados e/ou evitados e outros que não, tais como a idade ou a história familiar (23). Alguns dos fatores de risco associados ao cancro colorretal são:

- Idade: O risco de cancro colorretal aumenta com a idade.
- Género: As taxas de incidência de cancro colorretal são aproximadamente 30% mais elevadas em homens do que nas mulheres. A justificação para essa disparidade entre géneros ainda não é totalmente compreendida, mas pensa-se que esteja relacionada com os hábitos tabágicos e as hormonas sexuais;
- Etnia: As taxas de incidência de CCR são maiores em pessoas africanas e menores em pessoas de etnia asiática, quando comparadas com pessoas de etnia caucasiana.
- Sedentarismo: Pessoas com maior nível de atividade física têm 25% menos risco de sofrer de CCR (24).
- Dieta: É proposto que uma dieta rica em gorduras (especialmente gordura animal) e pobre em cálcio e fibras, pode aumentar o risco de cancro CCR (25).
- Doenças inflamatórias crónicas do intestino: Doenças crónicas tais como a colite ulcerativa ou a doença de Crohn, que provocam a inflamação do cólon, podem levar a um risco quase duplicado de desenvolvimento de cancro colorretal.
- História familiar e hereditária: Indivíduos que possuem um familiar de primeiro grau com história de cancro colorretal têm uma probabilidade duas a três vezes maior de também desenvolver a doença. Cerca de 5% dos doentes com cancro colorretal têm uma síndrome hereditária sendo a mais comum denominada de Síndrome de Lynch ou de cancro colorretal hereditário não polipoide (CCHNP) seguindo-se da Síndrome de polipose adenomatosa familiar (PAF). A Síndrome de Lynch, para além de aumentar

o risco do cancro, também provoca o aparecimento do mesmo numa idade mais precoce (45 anos) de forma comparada à população geral. A polipose adenomatosa familiar é caracterizada pelo aparecimento de centenas de pólipos colorretais nos indivíduos afetados (24).

### **1.3.3 Sintomatologia**

A grande dificuldade no cancro colorretal é que os sintomas não são exclusivos e como tal preditivos de doença. Para além disso, em estadios iniciais de CCR raramente se apresentam sintomas sendo, portanto, de grande importância a realização de rastreios, nomeadamente as sigmoidoscopias ou as colonoscopias. Em estadios mais avançados os sintomas mais frequentes incluem:

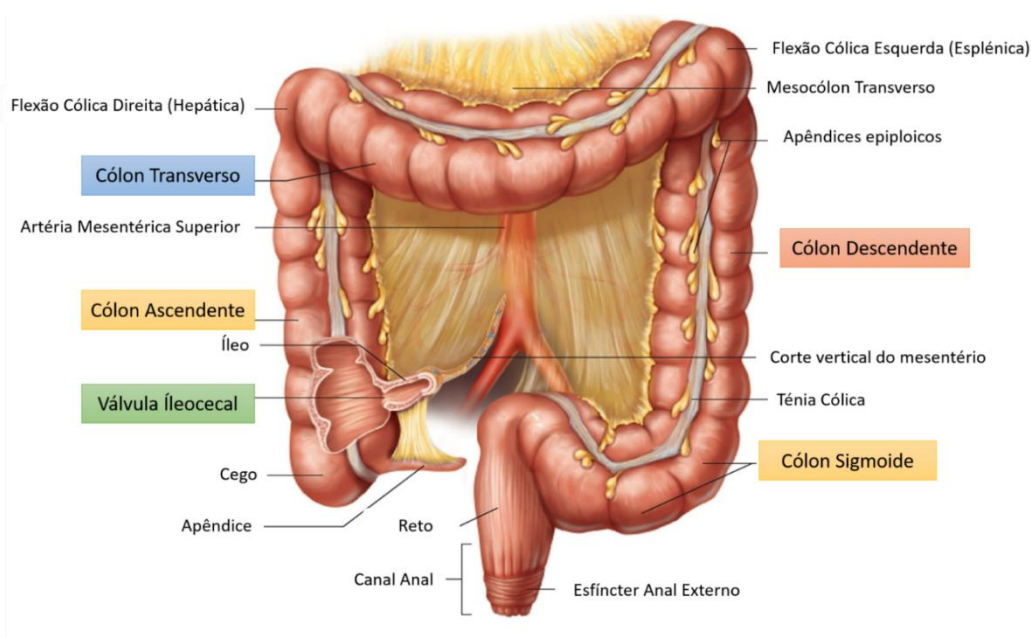
- Fezes mais escuras;
- Alteração de hábitos intestinais;
- Alterações na forma das fezes;
- Diarreia ou obstipação que dura mais que alguns dias;
- Sensação de que o intestino não esvazia completamente;
- Presença de sangue nas fezes;
- Desconforto abdominal;
- Perda de peso involuntária;
- Diminuição do apetite;
- Fadiga excessiva; (24)

### **1.3.4 Anatomia**

É importante conhecer a anatomia do local onde se origina uma doença de forma a poder atuar no tratamento da mesma. O cólon e o reto são elementos do intestino grosso e fazem parte do aparelho digestivo. O intestino grosso estende-se desde a extremidade distal do íleo até ao ânus com um comprimento de aproximadamente 1,5 metros. Começando no cego, o intestino grosso continua para cima com o cólon ascendente. Este, por sua vez, inicia-se na válvula ileocecal, passa pelo lado direito

da cavidade abdominal, faz a flexão cólica direita (hepática), dando assim começo ao cólon transverso que se estende até à flexão cólica esquerda (flexão esplénica) onde se inicia o cólon descendente que percorre o flanco abdominal esquerdo até ao cólon sigmoide. Na cavidade pélvica, o intestino grosso prossegue com o reto e no final encontra-se ainda o canal anal (figura 1.6) (26,27).

As paredes do intestino são constituídas por várias camadas de tecido: do interior para o exterior, a mucosa, a muscular da mucosa, a submucosa, a muscular, a subserosa e a serosa (26). O cólon, por sua vez, encontra-se fixo à parede abdominal posterior através de uma membrana peritoneal constituída por tecido seroso denominado de mesocólon (28).



**Figura 1.6** - Anatomia do intestino grosso. O cólon e o reto são elementos do intestino grosso. Adaptado de (27).

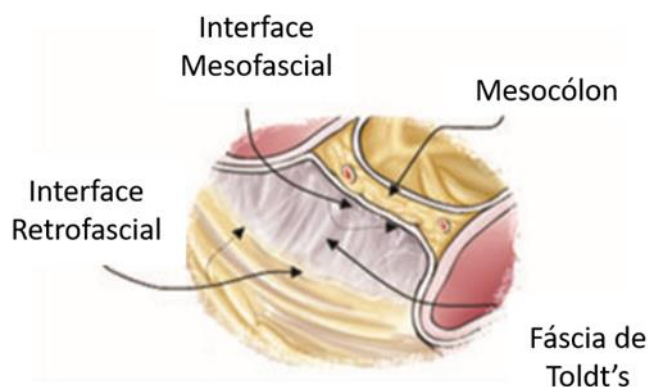
#### **1.3.4.1 Anatomia Mesentérica**

A anatomia mesentérica, foi inicialmente estudada e abordada, em 1889, por Sir Frederick Treves, que descreveu as estruturas mesentéricas como sendo independentes e separadas. De facto, o ensino convencional defendia que o mesocólon era fragmentado (29) e acreditava, tal como ditava Treves, na existência do mesentério do intestino delgado, do mesocólon transverso e do sigmoide (não interligados e fixados à parede abdominal posterior) e na inexistência do mesocólon ascendente e do descendente (30).

Recentemente o órgão mesentérico foi estudado e já não é considerado fragmentado nem complexo (31). Atualmente, é descrito como sendo uma estrutura contínua desde a flexão duodenojejunal (ângulo de *Treitz*) ao mesorreto (31,32). Assim, presentemente, conhece-se a existência do mesentério do intestino delgado, do mesocólon ascendente, transverso, descendente, sigmoide e mesorreto como sendo uma estrutura única (31).

A atual clarificação da estrutura mesentérica permitiu uma nova reavaliação da sua histologia, concluindo-se que o órgão mesentérico é revestido em ambas as faces por tecido conjuntivo mesotelial, que constitui a fáscia visceral (31) e que, entre essas duas camadas, se encontra a fáscia de Toldt, uma fina camada de tecido conjuntivo que contém canais linfáticos (figura 1.7) (33,34).

Por outro lado, a função do mesocólon tem sido igualmente estudada, assumindo-se o mesmo como um órgão essencialmente imunológico.



**Figura 1.7** - Ilustração esquemática da relação entre o mesocólon e a fáscia de Toldt. Adaptado de (34).

## **1.4 Estadiamento Tumoral**

O estadiamento tumoral refere-se à categorização do tamanho do tumor bem como ao conhecimento da sua extensão no corpo humano no momento de diagnóstico de doença (5). Trata-se de uma etapa essencial pois permite prever a sobrevida e influenciar a escolha do tratamento (35).

As duas classificações mais utilizadas no estadiamento do CCR são o *Tumor Node Metastasis* (TNM) e os critérios de Duke's (36). A classificação de Duke's engloba dois critérios importantes, a penetração do tumor e o envolvimento linfático, (tabela 1.1) (37) enquanto que, a classificação TNM da *Union for International Cancer Control* (UICC) que se encontra detalhada no Anexo I, é atualmente a mais utilizada e tem em conta três características: a profundidade de invasão na parede isto é, a extensão local do tumor primário não tratado (representado pela letra T), o envolvimento de gânglios linfáticos (letra N) e a presença de metástases à distância (letra M) (38,39). Este sistema de classificação propõe uma categorização em estadios desde o nível 0 até ao nível IV:

- Estadio 0: Carcinoma *in situ*;
- Estadio I: Tumor restrito a uma parte do corpo, sem comprometimento linfático;
- Estadio II: Tumor localmente avançando (pode ter invadido tecidos vizinhos, no entanto, as células cancerígenas não chegaram aos gânglios linfáticos);
- Estadio III: Tumor localmente avançado, espalhado por mais do que um tecido e causando comprometimento linfático (já atingiu os gânglios linfáticos vizinhos);
- Estadio IV: O tumor apresenta metástases à distância, ou seja, já se espalhou para outros órgãos/partes do corpo (5,39,40).

**Tabela 1.1** - Classificação de Duke's. Correlação entre o estadio do tumor no momento de diagnóstico e o seu prognóstico (37).

<b>Estadio de Duke's</b>	<b>Descrição</b>	<b>Sobrevivência aos 5 anos</b>
<b>A</b>	Tumor confinado à mucosa intestinal, sem invasão linfática nem presença de metástases	90%
<b>B</b>	Tumor que penetra a mucosa intestinal e atinge a serosa ou gordura periretal, sem invasão linfática nem metástases	60 a 70%
<b>C</b>	Tumor que invade os gânglios linfáticos	30 a 40%
<b>D</b>	Tumor com metástases à distância	Raro

#### **1.4.1 Sobrevida segundo o estadio no momento de diagnóstico**

A taxa de sobrevivência do cancro colorretal vai depender, em grande parte, do estadio em que o tumor se encontra no momento do diagnóstico de doença (Tabela 1.2) (41).

De facto, no CCR, a taxa de sobrevivência relativa aos 5 anos após o diagnóstico é de 65%. Apenas cerca de 39% dos pacientes que sofrem de cancro do cólon são diagnosticados com doença localizada, não metastática e, portanto, potencialmente curativa, porém, nessas situações as taxas de sobrevivência aos 5 anos são elevadas (cerca de 90%). Não obstante, estas taxas de sobrevivência diminuem drasticamente para 71% e para 14% em situações em que, respetivamente, no momento do diagnóstico se encontra doença regional ou doença metastática (24).

Assim, o diagnóstico precoce e o estadiamento revestem-se de uma importância fundamental, uma vez que o estadio da doença no momento do diagnóstico se apresenta como um fator preditivo da sobrevida (42).

**Tabela 1.2** - Estadios do cancro colorretal e correspondente taxa de sobrevivência. Adaptado de ABC of Colorectal Cancer (41).

<b>Estadio</b>	<b>Taxa de Sobrevivência</b>
Estadio 0	100%
Estadio I	90-100%
Estadio II	75-85%
Estadio III	30-40%
Estadio IV	<5%

#### **1.5 Budding Tumoral**

O *Budding* Tumoral (BT) define-se como a presença de células neoplásicas indiferenciadas, isoladas ou em pequenos grupos formados por menos de 5 células que se encontram na linha invasiva tumoral (43–47).

Apesar de, biologicamente, BT ainda não estar totalmente definido sabe-se que este apresenta semelhança com a transição epitélio-mesenchima (EMT) (43,45,48). Sendo a

EMT um processo caracterizado por perda de moléculas de adesão celular, alterações no citoesqueleto, ganho de resistência à apoptose e aumento da capacidade de degradação da membrana basal, (48–50) o TB tem sido associado a um fenótipo maligno (44).

O BT, atualmente, é definido como um marcador de prognóstico adicional, (51) no entanto, apresenta-se como uma promessa clínica benéfica devido à simplicidade da sua deteção recorrendo a técnicas de coloração com hematoxilina-eosina (43,52).

De facto, BT apresenta-se como um bom fator de prognóstico adicional, principalmente, no CCR uma vez que se encontra presente em todas as suas fases: em cerca de 15-17% dos doentes com pT1; 26% com pT2, 36-51% com pT3 e em mais de 73% dos doentes com pT4 (53).

Adicionalmente, vários estudos indicam que a presença de BT está associada a invasão linfática, (44,47–49) invasão vascular, (48,49) invasão perineural, (54) risco de recorrência local, (44,49) metástases ganglionares linfáticas (48,49) e metástases à distância (43,48,49,54) e ainda a uma menor sobrevida livre de doença (43,48,49).

## **1.6 Grau Histológico Tumoral**

Em 2008, houve uma alteração no que respeita às recomendações de classificação histológica dos espécimes cirúrgicos de carcinoma colorretal (55). A partir daí, a divisão do grau histológico passou a ser feita entre as denominações bem, moderadamente e pouco diferenciado tal como descrito na tabela 1.3.

**Tabela 1.3** - Grau histológico tumoral. Adaptado de (55).

<b>Grau Histológico</b>	<b>Descrição</b>
Pouco diferenciado	Glândulas altamente irregulares ou perda de diferenciação glandular e perda de polaridade nuclear.
Moderadamente diferenciado	Diferenciação glandular menos regular, polaridade nuclear mal identificada ou perdida.
Bem diferenciado	Túbulos simples ou complexos, polaridade nuclear facilmente identificável, uniformidade do tamanho nuclear, grande semelhança com a lesão benigna precursora.

## **1.7 Tipo Histológico Tumoral**

A compreensão do valor prognóstico do tipo histológico tumoral é dificultada pelo défice de dados que definem a verdadeira relação entre o tipo histológico, o grau e as características genéticas do tumor. Esta declaração é, particularmente, relevante no caso do adenocarcinoma mucinoso, um tipo histológico bastante comum em CCR. De facto, alguns estudos realizados em CCR indicaram que, a presença do tipo histológico mucinoso pode representar um prognóstico adverso, especialmente se ocorrer em regiões anatómicas específicas do intestino (por exemplo, no reto-sigmoide) ou em subconjuntos específicos de pacientes (por exemplo, com idades inferiores a 45 anos) (56).

## **1.8 Tratamento do Cancro Colorretal**

O tratamento para CCR tem vindo a melhorar ao longo dos últimos tempos em virtude dos desenvolvimentos e avanços nas técnicas de imagem, nas técnicas cirúrgicas e na quimioterapia. No entanto, a decisão do tratamento a aplicar deve considerar as opções disponíveis e as características do tumor tais como o estadio e a sua localização uma vez que, os resultados do tratamento variam amplamente com base nas características moleculares específicas de cada tumor (24).

De facto, o tratamento para o CCR varia consoante o estadio em que o doente se encontra, não obstante, é de consenso que em estadios mais precoces do CCR como o I e o II, normalmente, é realizada uma cirurgia para retirar o tumor primário e os nódulos linfáticos regionais (57). A extensão da cirurgia para a remoção do tumor primário dependerá da disseminação do tumor. Numa excisão simples, o tumor é removido localmente a partir da camada interna superficial da parede intestinal. Quando o cancro se desenvolve a partir de um pólipó, é realizado uma polipectomia onde se remove todo o pólipó. Podem ainda realizar-se ressecções padronizadas para remover o cólon ascendente (hemicolectomia direita), ou o cólon descendente (hemicolectomia esquerda), ou o sigmoide (ressecção do sigmoide). A hemicolectomia direita e esquerda alongam-se, por vezes, ao cólon transversal, sendo posteriormente designada por hemicolectomia (direita ou esquerda) alargada. Nestas ressecções padronizadas, o segmento correspondente do intestino é então removido, bem como os gânglios linfáticos regionais e qualquer parte dos órgãos adjacentes que tenha sido invadida pelo tumor (58). Para os pacientes que se encontram nos estadios II ou III do CCR podem ser aplicados tratamentos de quimioterapia neoadjuvante ou radioterapia, apesar de que, para o estadio

II, o tratamento ser um pouco contestado, uma vez que, o risco de recorrência do cancro varia entre os doentes. Nos casos de cancro CCR no estágio III, que apresentam envolvimento ganglionar, a administração de quimioterapia após a cirurgia é aconselhada de modo a reduzir a possibilidade de recidiva da doença e o aumento da probabilidade de cura. Porém, a verdade, é que grande parte dos doentes com CCR apresentam metástases e, nesses casos, a terapêutica é mais complexa (57). Efetivamente, quando o cancro se consegue espalhar para órgãos e tecidos distantes criando metástases no fígado e nos pulmões, por exemplo, normalmente tenta-se realizar uma abordagem cirúrgica para remover as metástases e consequentemente melhorar a sobrevida do doente (24). No entanto, em locais onde a intervenção cirúrgica é muito difícil deve-se oferecer quimioterapia paliativa ou neoadjuvante (57).

### **1.8.1 Técnica Cirúrgica: Excisão Completa do Mesocólon**

A técnica cirúrgica da excisão completa do mesocólon “*Complete Mesocolic Excision*” (CME) surgiu em 2008, segundo Hohenberger (59) após o sucesso que a Excisão Total do Mesorreto (ETM) teve sobre as taxas de recidiva local na neoplasia do reto (60–62).

Apesar do sucesso com a ETM, na cirurgia do cólon os conceitos não se encontravam estandardizados daí que, Hohenberger et al descrevessem, pormenorizadamente, a CME de forma a operacionalizar e generalizar situações na cirurgia do cólon. Assim, em 2008, a CME foi descrita como uma técnica mais radical tendo, no entanto, como base teórica e conceptual os mesmos princípios: dissecação cortante fina ao longo de planos embriológicos, laqueação vascular central e obtenção de um espécime operatório com um envelope mesocólico íntegro, de superfície regular (59). Consegue-se, deste modo, com a CME, uma apropriada exposição da raiz dos vasos cólicos, permitindo a laqueação central das artérias nutritivas do tumor e das suas veias de drenagem, a colheita do maior número de gânglios linfáticos possível, objetivando uma diminuição da recidiva local e uma melhoria da sobrevida global (59,62).

Quando comparamos a CME com a cirurgia convencional verifica-se que as taxas de recidiva local para CME são de 3,6% e sobrevida global aos 5 anos de 81%. Estes resultados correspondem a uma melhoria substancial de cerca de 13% em relação à cirurgia tradicional (63). No entanto, ainda existe alguma falta de consenso em relação à CME uma vez que, alguns autores, apontam desvantagens nesta cirurgia pelo facto de ser

uma cirurgia mais demorada, o que pode levar a riscos intrínsecos de uma anestesia mais prolongada. Há quem defenda ainda como inconvenientes as potenciais lesões do plexo autonómico no momento da linfadenectomia radical ao nível dos vasos mesentéricos superiores, lesões isquémicas da grande curvatura gástrica, o risco de lesões vasculares *major* e a maior taxa de deiscência da anastomose (62,64).

Assim, a CME apresenta-se como uma técnica alternativa e favorável, com melhores resultados oncológicos e que não apresenta agressão cirúrgica superior, uma vez que, apresenta taxas de morbidade e mortalidade pós-operatórias semelhantes às da cirurgia tradicional (59,62,65).

### **1.9 Angiogénese e Linfangiogénese**

O cancro tem a capacidade de se espalhar para órgãos adjacentes ou distantes, gerando metástases. Para tal, as células tumorais transpõem e fazem uso de vasos sanguíneos e/ou linfáticos, daí que, para o tumor, o crescimento de uma rede vascular seja importante. Os processos pelos quais novos vasos sanguíneos e linfáticos se formam são chamados de angiogénese e linfangiogénese, respetivamente (66).

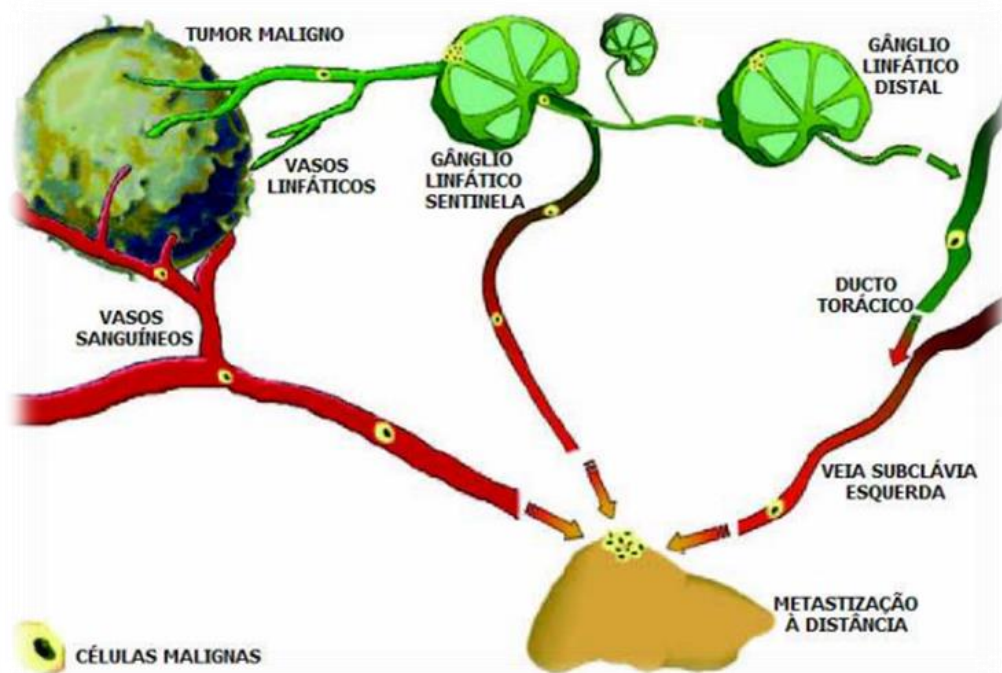
A angiogénese tumoral, um dos *Hallmarks of Cancer*, (3) consiste num processo de múltiplas etapas. Inicialmente, a membrana basal nos tecidos é destruída e iniciam-se os processos de hipóxia. Em seguida, as células endoteliais ativadas por fatores angiogénicos começam a migrar fazendo com que proliferem e estabilizam. A angiogénese tumoral permite aos tumores adquirirem os nutrientes e o oxigénio que necessitam para crescer (66).

A linfangiogénese caracteriza-se pela formação de vasos linfáticos. As células cancerígenas são capazes de induzir linfangiogénese uma vez que expressam altos níveis de fatores linfangiogénicos (67). De facto, os vasos linfáticos representam uma das principais e preferenciais vias de metastização dos tumores, (68) embora alguns estudos demonstrem que a linfangiogénese não é um requisito necessário à metastização por via linfática, pois as células malignas podem disseminar-se através dos vasos linfáticos pré-existentes (69).

### **1.9.1 Disseminação Tumoral: Via Hematogénica e Via Linfática**

Para que ocorra o crescimento do tumor, as células malignas libertam fatores que lhes fornecem oxigénio e nutrientes favorecendo a metastização por via hematogénica ou por via linfática. Na via hematogénica, os tumores fazem uso dos vasos sanguíneos pré-existentes nas suas imediações para conseguirem atingir os órgãos distantes. No entanto, nesta via, o uso preferencial dos tumores parece incidir sobre os vasos sanguíneos recém-formados (70).

A linfangiogénese peritumoral e a linfangiogénese intratumoral é necessária para manter o equilíbrio do tumor. Na via de metastização linfática também parecem ser os vasos linfáticos formados de novo o meio preferencial para que as células malignas consigam alcançar a corrente linfática, migrar e atingir primeiramente o gânglio sentinela, e, posteriormente, os gânglios linfáticos distais, até metastizarem os órgãos mais distantes (figura 1.8) (71,72).



**Figura 1.8** - Vias de disseminação tumoral. Via hematogénica e via linfática. Adaptado de (71).

Os tumores escolhem, preferencialmente, a via linfática para metastização uma vez que, o transporte de células malignas pela corrente linfática representa uma vantagem

em relação ao transporte pela corrente sanguínea porque os capilares linfáticos possuem maior diâmetro do que os capilares sanguíneos (73).

Assim, para que os tumores se tornem malignos e adquiram a capacidade de metastização fazem uso da via hematogénica, da via linfática ou de ambas as vias de disseminação cancerígena. Existem estudos que comprovam que cerca de 80% dos tumores preferem uma propagação através da corrente linfática, (74) logo, o sistema vascular linfático constitui a principal via de disseminação de diversos tipos de tumores, principalmente carcinomas, que habitualmente estão associados a prognósticos desfavoráveis (75). Deste modo, torna-se importante compreender os mecanismos que medeiam a metastização por via linfática, nomeadamente a linfangiogénese tumoral.

### **1.10 A importância da linfangiologia no Cancro Colorretal**

Uma ressecção inadequada do mesentério no momento da cirurgia pode resultar num pior prognóstico no cancro do cólon sendo que, se pressupõe, que tal aconteça como consequência da rutura da integridade do pacote linfático mesentérico (76). De facto, já em 1909, Jamieson e Dobson descreveram o conjunto dos vasos linfáticos que drena o cólon e destacaram que o sucesso do tratamento de doenças malignas dependia da remoção da área linfática afetada (76,77). Este princípio foi propagado para os dias de hoje e é aplicado, atualmente, na técnica cirúrgica da excisão completa do mesocólon (CME) demonstrado melhores taxas de sobrevida (59). Conjetura-se assim, que essas observações e melhorias estejam relacionadas com a remoção completa do pacote linfático mesentérico (76).

Na verdade, os vasos linfáticos são um componente importante do sistema imunológico sendo que, a disseminação de células tumorais através deles para os gânglios linfáticos apresenta-se como um indicador relevante de malignidade (78). Assim, torna-se cada vez mais importante saber estudar e identificar a linfangiogénese do tumor.

No entanto, é necessário conseguir visualizar os capilares linfáticos, que estão dentro e ao redor do tumor e que geralmente são pequenos e difíceis de distinguir. Por outro lado, a utilidade na prática clínica diária é questionável, dado o facto de o seu valor prognóstico carecer de comprovação científica.

Para que os vasos linfáticos possam ser quantificados e a sua densidade possa ser registada e correlacionada com os vários parâmetros clínicos, como invasão, o

prognóstico ou sobrevida a longo prazo, é necessário identificar esses mesmos vasos linfáticos utilizando marcadores específicos.

Nos últimos anos, tornou-se possível distinguir a vascularização sanguínea e linfática, graças à identificação de novos marcadores endoteliais linfáticos, tais como a podoplanina, uma pequena proteína (162 resíduos) que é altamente expressa na maioria dos endotélios linfáticos vasculares (79). Para além disso, a podoplanina, apresenta a vantagem de ser compatível com a aplicação de seções de tecido embebidas em parafina (80) e de ser amplamente expressa em carcinomas de cólon (81,82) tanto que, um consórcio internacional, recomendou o uso preferencial da podoplanina D2-40 como marcador para estimar a densidade de vasos linfáticos em estudos de neoplasias (83).

## **2. HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótese:**

O mesentério apresenta-se como um órgão imunológico que protege o desenvolvimento de cancro. A remoção cirúrgica completa do mesocólon e a consequente remoção do envelope mesentérico que rodeia o tumor permite uma melhor limpeza oncológica de células tumorais e de células imunes que são importantes para a metastização do cancro. A metastização pode ocorrer via vasos linfáticos e/ou sanguíneos, no entanto encontra-se descrito que a componente linfática é um elemento importante do sistema imunológico e que, a grande maioria dos tumores faz uso desta via para metastização. De forma a tentar compreender o papel que uma rede linfática complexa representa no prognóstico da doença e na disseminação tumoral, foi-se estudar a densidade linfática mesentérica em adenocarcinomas do cólon tendo como foco a seguinte hipótese:

Se o mesentério é um órgão imunológico, então a remoção completa do envelope mesentérico representa uma melhoria no prognóstico da doença e na diminuição de recidivas uma vez que, não há disrupção da rede linfática que drena o mesentério e, como tal, ocorre uma melhor limpeza oncológica de células tumorais e de células imunes que se consideram importantes para a capacidade de metastização.

### **2.2 Objetivos:**

O objetivo principal deste estudo foi:

Determinar, em doentes com adenocarcinoma do cólon, a densidade linfática mesentérica em regiões peritumorais e em regiões distais ao tumor, através do recurso à imunohistoquímica, nomeadamente, à utilização do anticorpo monoclonal D2-40 da podoplanina.

O objetivo secundário do trabalho foi:

- Correlacionar a densidade linfática mesentérica com diferentes características clínico-patológicas e clínico-histológicas relacionadas com o tumor.

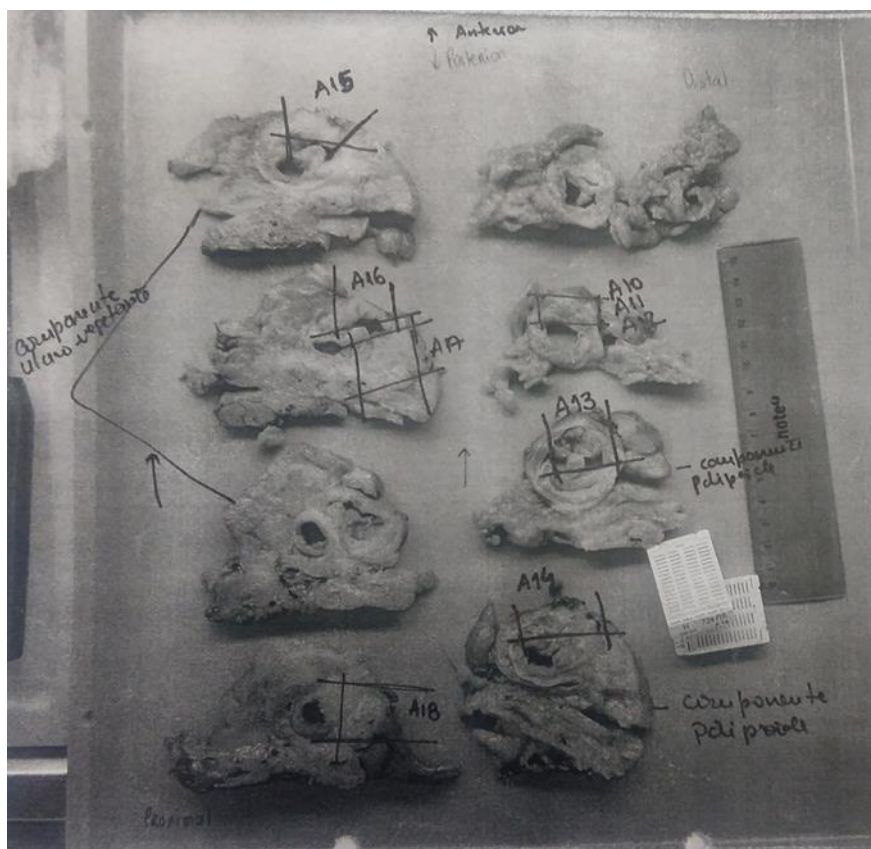
### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Colheita de Amostras**

Este estudo foi realizado através da utilização de amostras de 49 casos de adenocarcinoma (ADC) do cólon. Para a seleção das amostras utilizou-se, inicialmente, todos os casos operatórios de ADC do cólon realizados no Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca (HFF) entre o ano de 2016 e o ano de 2018, tendo-se conseguido um total de 1189 amostras. Subsequentemente, para uma otimização do processo de triagem, aplicou-se um critério de exclusão ao estudo linfangiológico. Assim, todos os casos de ADC do cólon que não tivessem presente no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do HFF, os respetivos mapeamentos adquiridos no momento do processamento macroscópico da peça cirúrgica ao nível da rotina do próprio SAP, eram excluídos. Após este processo de seleção, chegou-se, então, aos 49 casos utilizados como amostras finais deste estudo. Estes 49 casos resultam de casos operatórios realizados no HFF no período de 2017-2018 uma vez que, só a partir do início do ano de 2017, o SAP passou a implementar o sistema de mapeamento. Foram avaliadas, para os 49 casos, diversas características clínico-patológicas e clínico-histológicas que irão ser discutidas mais à frente.

#### **3.2 Macroscopia das peças cirúrgicas**

Todos os casos clínicos utilizados neste estudo tinham sido previamente sujeitos a uma análise macroscópica cuidada por parte do SAP do HFF. Neste serviço, todas as peças de adenocarcinoma do cólon são rigorosamente tratadas segundo um protocolo que se encontra descrito no Anexo II. É nesta fase da macroscopia que se realiza a identificação e orientação do espécime cirúrgico e se procede à sua fixação em formol tamponado. Apesar da peça ser medida a fresco, após a sua fixação em formal toda a peça volta a ser medida (comprimentos e diâmetros), marcam-se as margens cirúrgicas e/ou outras estruturas relevantes com tinta *nanquim* e procede-se ao corte das áreas de interesse para inclusão em parafina. É ainda na fase da macroscopia que se procede à realização do registo fotográfico do espécime completo e das secções já fatiadas/cortadas que irão ser inclusas em parafina. Este registo fotográfico torna-se fundamental pois é através dele que é possível realizar o mapeamento do ADC do cólon (figura 3.1), sendo a presença deste mapeamento um dos critérios fundamentais para a seleção do caso clínico e a utilização do mesmo neste estudo.



**Figura 3.1** - Mapeamento de um adenocarcinoma do cólon realizado no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca.

### **3.3 Identificação dos espécimes cirúrgicos através dos mapeamentos da Anatomia Patológica**

Recorrendo aos mapeamentos originados através dos registos fotográficos e análises macroscópicas dos espécimes cirúrgicos selecionou-se, para cada caso clínico, as melhores áreas, entre as diferentes já cortadas/fatiadas e inclusas nas cassetes de parafina. Esta seleção foi realizada tendo por base as regiões que aparentavam ter mais gordura (uma vez que o objetivo era analisar a região mesentérica que por sua vez é constituída por tecido conjuntivo mas também por tecido adiposo) sendo que, para cada caso clínico, era selecionado sempre pelo menos uma região perto do tumor (peritumoral) e uma outra, mais distante do tumor, no local de laqueação.

Através desta análise aos mapeamentos selecionou-se um total de 169 lâminas que tinham sido previamente coradas com hematoxilina e eosina pelo serviço SAP do HFF e que, posteriormente, foram analisadas ao microscópio de luz Leica DM2000 Led, com um acessório de câmara ICC50 HD (Leica *Microsystems Limited*, Suíça).

### **3.4 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)**

As 169 lâminas resultantes da primeira análise aos 49 casos de adenocarcinoma do cólon em estudo, foram sujeitas a uma análise histopatológica. Os tecidos presentes nestas lâminas tinham sido previamente cortados a 1.5µm de espessura, colocados numa lâmina e corados com hematoxilina e eosina (HE) no SAP do HFF consoante o protocolo descrito no Anexo III. O procedimento HE é uma técnica extremamente utilizada devido à sua simplicidade (84) sendo que, mancha de cores contrastantes o núcleo e o citoplasma (85) (a hematoxilina, um corante nuclear básico, cora os núcleos de azul e a eosina, um corante citoplasmático ácido, cora o citoplasma de rosa) (84) de forma a diferenciar rapidamente os componentes celulares. No entanto, os resultados da coloração dependem do processamento adequado da amostra, que envolve a preservação de tecidos, a desidratação, a limpeza e a infiltração de parafina (85).

O recurso às lâminas previamente coradas pelo SAP do HFF foi necessário para que se identificasse dentro das zonas de tecido adiposo peritumoral e distal ao tumor, as localizações onde era mais provável conseguir encontrar vasos linfáticos no momento da realização da técnica de imunohistoquímica. Assim sendo, após a execução desta análise histopatológica reduziu-se de 169 para 98 (1 região peritumoral e 1 região distal ao tumor para cada um dos 49 casos) o número de lâminas a efetivamente utilizar ao longo do restante estudo.

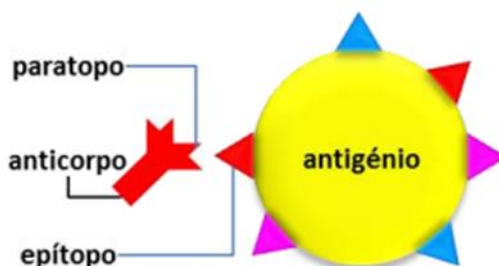
### **3.5 Microtomia**

Subsequentemente à análise de todas as lâminas de HE para cada caso clínico e à definição das zonas desejáveis a cortar, procedeu-se ao corte dessas mesmas zonas no micrótomo Leica RM2245 do SAP do HFF. Cada corte foi realizado com uma área aproximada de 1cm<sup>2</sup> sendo que, a espessura de corte do tecido manteve-se a 1.5µm (medida de corte otimizada no serviço SAP do HFF). Após o corte, o tecido foi colocado em lâminas X-tra<sup>TM</sup> que possuem uma superfície carregada positivamente (uma vez que, a carga elétrica dos tecidos é maioritariamente negativa, as lâminas apresentam uma carga oposta) (86) o que ajuda a ligar as secções de tecido à sílica do vidro das lâminas sem o uso de adesivos adicionais (87). Sequentemente, as lâminas foram colocadas em estufa durante 60 minutos a 64°C para que o tecido conseguisse a aderência necessária às lâminas.

### **3.6 Imunohistoquímica (IHQ)**

As técnicas imunohistoquímicas utilizam anticorpos específicos para identificar e detetar antígenos em cortes teciduais por meio de reações imunológicas e químicas (86). Esta técnica é altamente sensível e específica e pode detetar uma grande variedade de antígenos em várias espécies animais (88).

Um antígeno é geralmente uma molécula com uma dimensão razoável que apresenta na sua superfície, um ou mais locais específicos de ligação ao anticorpo denominado de epítopo. Uma vez introduzido num organismo, induz uma resposta por parte do sistema imunitário que leva à produção de anticorpos específicos. Os anticorpos, por sua vez, são moléculas de natureza proteica que são produzidas em resposta à presença de antígenos sendo que, se combinam com estes quando as condições fisiológicas favorecem a sua ligação. O local de ligação do anticorpo ao epítopo é denominado paratopo sendo esta ligação a reação base da imunohistoquímica (figura 3.2) (86).

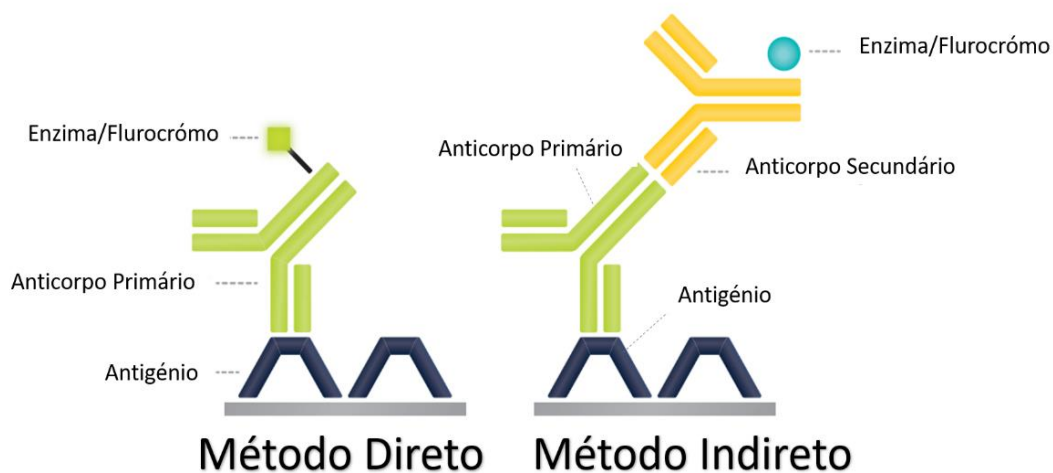


**Figura 3.2** - Ligação antígeno-anticorpo. Adaptado de (86).

De forma a conseguir visualizar e detetar a ligação entre os anticorpos e os antígenos foi necessário arranjar estratégias para a ampliação do sinal tornando-o mais potente. Para tal, atualmente, existem diferentes métodos de imunohistoquímica que ambicionaram associar o máximo de moléculas visualizáveis ao complexo anticorpo-antígeno. Os dois métodos básicos de IHQ, são o método direto e o método indireto (figura 3.3) (86).

No método direto é utilizado unicamente um anticorpo primário, que possui um marcador e que se liga diretamente ao antígeno. Este método é simples e rápido, no entanto, apresenta como desvantagens, a pouca ampliação de sinal e acaba por ser dispendioso, pois exige que os anticorpos primários possuam marcador. No método indireto, recorre-se a dois tipos de reagentes, o anticorpo primário e o anticorpo secundário. Neste método, o anticorpo primário dirigido ao antígeno de interesse é reconhecido por anticorpos secundários, que amplificam o sinal. Este método possui

como principais vantagens o facto de ser mais sensível do que o método direto e por deter uma maior versatilidade, pois basta possuir um anticorpo secundário marcado não sendo necessário que os primários estejam marcados tornando-se assim mais económico. Como desvantagens, tecnicamente, é mais demorado e complexo do que o método direto (86,89).



**Figura 3.3** - Método direto e método indireto de imunohistoquímica. O método direto é realizado apenas numa etapa, em que o anticorpo primário (verde) está ligado a uma enzima ou fluorocromo. O método indireto é realizado em duas etapas, sendo utilizado um anticorpo secundário ligado a uma enzima para reconhecer o anticorpo primário ligado ao antígeno do tecido. Adaptado de (89).

Presentemente, a técnica de imunohistoquímica pode ser realizada de forma manual ou em sistemas automatizados que se encontram disponíveis no mercado tais como o Ventana Ultra e o Leica BOND-III. Os sistemas automáticos, aplicam tecnologias de alta gama e conseguem padrões de imunomarcção de elevada qualidade para além de serem capazes de realizar os procedimentos de desparafinação, hidratação e recuperação antigénica no interior da plataforma (86).

### **3.6.1 Imunohistoquímica realizada em sistema automático Leica BOND-III**

O BOND- III é um equipamento totalmente automatizado (figura 3.4) que auxilia os técnicos de Anatomia Patológica num diagnóstico mais preciso e imediato. Trata-se, pois, de um equipamento de coloração automático, que permite realizar tanto protocolos da

técnica de IHQ como de Hibridização in situ (HIS). Foi desenvolvido pela Leica Biosystems com o intuito de melhorar o fluxo de trabalho, a rapidez, a eficiência e a confiança no diagnóstico de doenças cancerígenas visando a promoção de um diagnóstico mais preciso e fiável (90).

Este equipamento possui três tabuleiros independentes cada um com capacidade para 10 lâminas. Assim, o BOND-III tem capacidade para processar 30 lâminas de forma paralela e contínua sendo que, demora aproximadamente entre 2 horas e 30 minutos a 3 horas a completar um procedimento completo. Uma vez que, tem espaço para 36 reagentes, este equipamento fornece ainda flexibilidade para executar procedimentos de IHQ e HIS ao mesmo tempo (90).



**Figura 3.4** - Equipamento automatizado de imunohistoquímica BOND- III da Leica. Adaptado de (90).

### **3.6.2 Protocolo Imunohistoquímico**

A IHQ foi realizada em secções de tecido parafinado cortado a 1.5µm de espessura, aderidos a lâminas adesivadas X-tra™. A técnica foi realizada em todas as 49 amostras tanto nas regiões peritumorais como nas regiões distais ao tumor. Às lâminas foi

adicionado um controlo tecidual externo e positivo de amígdala (que apesar de possuir vasos linfáticos não foi sujeita ao mesmo procedimento de fixação e processamento).

As secções de tecido foram posteriormente processadas no equipamento automático de coloração BOND-III (Leica *Biosystems*) segundo o protocolo descrito no Anexo IV. O anticorpo monoclonal D2-40 da podoplanina (Hoffmann-La Roche Ltd) foi o anticorpo utilizado para a realização da IHQ no equipamento BOND-III com o objetivo de avaliar a densidade linfática nas regiões peritumorais e distais ao tumor de cada um dos 49 casos de ADC do cólon. O anticorpo monoclonal D2-40 da podoplanina foi otimizado tendo em conta os parâmetros descritos na tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Condições otimizadas e anticorpo primário utilizado neste estudo.

Anticorpo Primário	Clone	Recuperação Antigénica	Diluição	Tempo de Incubação	Tipo de Marcação	Controlo Positivo	Origem do Anticorpo
Podoplanina	D2-40	BOND ER2 (Leica <i>Biosystems</i> )  20 minutos a 100°C	Pré-diluído	20 minutos	Citoplasmática	Amígdala	Ventana, Roche

No equipamento automatizado BOND-III da Leica *Biosystems*, cada lâmina foi processada individualmente, começando pelo aquecimento das lâminas até 72°C, seguido de desparafinação com a solução *Bond Dewax*, uma solução que permite que a parafina seja removida das secções tecidulares antes da reidratação e coloração (91). De seguida, as lâminas são mergulhadas em concentrações decrescentes de etanol até à água (H<sub>2</sub>O) destilada de forma a completar a reidratação dos tecidos. Posteriormente, procede-se à recuperação antigénica utilizando para tal uma solução baseada em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) denominada *Bond Epitope Retrieval 2* (ER2) da Leica *Biosystems* com pH 9 cuja função é expor os epítomos presentes nos tecidos em teste (92). O passo seguinte passa pelo bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução comercial de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% da Leica (92). Sequentemente, as secções de tecido aderidas às lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, durante 20 minutos. No entanto, antes deste passo, realizam-se lavagens com uma solução

denominada *Bond Wash* da Leica que ajuda a garantir que o excesso do reagente anterior foi corretamente removido dos tecidos antes de se adicionar o anticorpo primário. De igual forma, uma série de lavagens de 2 minutos são realizadas com a solução *Bond Wash* antes de se adicionar o próximo reagente, o pós-primário, durante 8 minutos. Seguidamente, e após uma nova série de lavagens o sistema automatizado BOND-III adiciona às lâminas um polímero que permite uma intensificação da coloração. O passo seguinte trata-se da incubação das secções de tecido com uma mistura de um substrato e de um cromogénio de *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) o que gera uma reação enzimática para a deteção da interação antigénio-anticorpo (93). Esta reação enzimática origina um precipitado castanho-bronze que permite a visualização das moléculas que interagiram (86). Uma vez que, o DAB é insolúvel em álcool e outros solventes orgânicos é necessário, antes da sua aplicação, que o sistema automatizado BOND-III realize ciclos de lavagem com água destilada de forma a que o DAB se consiga fixar e exercer a sua função. Após a adição de DAB um novo ciclo de lavagens com H<sub>2</sub>O destilada é executado e, posteriormente, é aplicado um DAB *Enhancer* que tem como função mudar a cor da reação do DAB de cobre para castanho escuro, isto é, intensificar a coloração. Assim, o DAB *Enhancer* proporciona um aumento no contraste entre a coloração cromogénica específica do DAB e o pano de fundo do tecido auxiliando a identificação dos antígenos (94). Por fim, após novo ciclo de lavagens com água destilada o sistema automatizado da Leica contrasta as secções de tecido com Hematoxilina, um corante nuclear básico que, cora os núcleos das células, permitindo visualizar a sua morfologia.

### **3.6.3 Montagem das lâminas de Imunohistoquímica**

O procedimento de imunohistoquímica termina quando, após o ciclo da BOND-III da Leica ter terminado, as secções de tecido são manualmente desidratadas com concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%), diafanizadas em xilol e montadas com resina (*Entellan*) com a colocação da lamela.

### **3.7 Revisão das lâminas de IHQ**

Todas as lâminas que foram sujeitas ao processamento de IHQ pelo sistema automatizado BOND-III da Leica foram posteriormente revistas e analisadas utilizando um microscópio de luz Leica DM2000 Led, com um acessório de câmara ICC50 HD e

uma lente de ampliação Leica  $\infty$ /- HI PLAN 10x/0.25 (Leica *Microsystems Limited*, Suíça) do serviço SAP do HFF. A revisão e interpretação de cada lâmina foi conduzida tendo por base sempre o mesmo critério e com foco na presença de vasos linfáticos nas camadas de tecido da subserosa e serosa das regiões mesentéricas peritumorais e distais ao tumor. Como foram examinadas para cada um dos 49 casos em estudo 2 zonas mesentéricas diferentes, um total de 98 áreas de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de tecido distribuídas por 15 lâminas X-tra<sup>TM</sup> foram revistas.

### **3.8 Avaliação dos Vasos Linfáticos**

A estimativa do número médio de vasos linfáticos presentes nas secções de tecido sujeitas a IHQ foi obtida definindo-se uma área de 1mm<sup>2</sup> sobre um campo escolhido aleatoriamente para cada região peritumoral e distal ao tumor. Dentro desse quadrado de referência foi feita uma contagem de todos os testes imunopositivos situados totalmente dentro dele. Apenas os vasos que estavam totalmente dentro do limite do quadrado de 1mm<sup>2</sup> foram contabilizados, sendo que, aqueles que cruzavam o quadrado ou que estavam fora dos seus limites não foram contados. Registaram-se todos os vasos quer estes tivessem forma luminal ou forma linear desde que, houvesse neles captação do anticorpo monoclonal D2-40. O número de vasos linfáticos presente em cada secção de tecido foi depois dividido pela área do quadrado de referência (1mm<sup>2</sup>) para se definir a densidade linfática.

$$\text{Densidade Linfática} = \frac{\text{Número de Vasos Linfáticos dentro do quadrado de referência}}{\text{Área do quadrado de referência}}$$

### **3.9 Parâmetros Clínico-Patológicos e Clínico-Histológicos**

Foram analisados os registos clínicos e anatomopatológicos de todos os doentes, com colheita sistematizada por meio de consulta do Processo Clínico Individual dos seguintes parâmetros:

- Idade;
- Género;
- Peso e Altura (IMC);
- Localização do tumor;

- Tipo de Cirurgia efetuada;
- Estadiamento TNM;
- N° de gânglios isolados e positivos;
- Tamanho e perímetro do tumor;
- Grau de diferenciação tumoral e presença de componente mucinosa;
- Presença de *budding* tumoral;
- Invasão perineural e linfovascular;
- Infiltração linfocítica intratumoral e peritumoral;
- Integridade do mesocólon.

### **3.10 Análise Estatística**

A análise dos resultados foi realizada utilizando o software IBM SPSS versão 22.0. O nível de significância estatística considerado foi de  $p < 0,05$ .

Com recurso ao IBM SPSS, foi efetuada, inicialmente, uma análise descritiva dos dados por meio de uma análise das suas frequências. Foram ainda, mais tarde, aplicados os testes paramétricos: teste-t para amostras independentes e o *One-way* ANOVA isto porque tínhamos uma amostra superior a 30, atribuindo-lhe assim, uma distribuição normal. O teste-t para amostras independentes foi usado quando se pretendia realizar uma análise para as médias e desvio-padrão de amostras independentes e o teste *One-way* ANOVA para a comparação de duas ou mais variáveis independentes. Fez-se ainda uso do construtor de gráficos do IBM SPSS, nomeadamente, para a construção de diagramas de caixa e de gráficos de dispersão.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise das características Clínico-Patológicas

O presente estudo foi realizado numa amostra de 49 casos de adenocarcinoma do cólon. Nestes 49 casos a grande parte dos doentes (34,7%) tinha idades superiores a 80 anos. Quanto ao género, embora a amostra esteja extremamente equilibrada verificou-se a supremacia de doentes do sexo masculino. A maioria dos doentes com ADC do cólon (53,1%) foram submetidos a uma cirurgia denominada de hemicolectomia direita o que é coincidente com o facto de o maior número de tumores descritos, entre os 49 casos analisados, se localizarem no cólon ascendente (36,7%). Mais de metade (51,0%) dos doentes com ADC do cólon estudados possuía excesso de peso e a grande maioria encontra-se vivo (35/49) após a cirurgia sendo que, dos que faleceram, a média de dias de sobrevivência é de  $109,5 \pm 155,5$ . Todos estes dados anteriormente referenciados estão descritos mais pormenorizadamente na tabela 4.1.

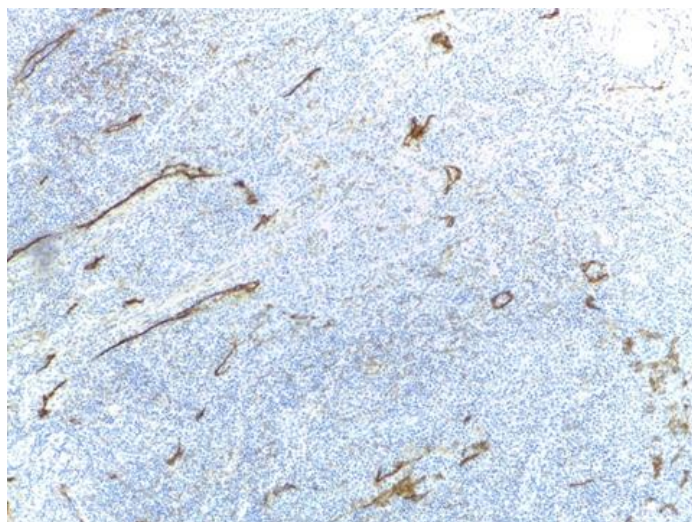
**Tabela 4.1** - Características clínico-patológicas dos 49 casos de adenocarcinoma do cólon.

Características	Frequência (n)	Percentagem (%)	
<b>Idades</b>	< 50 anos	4	8,2
	≥ 50 anos e < 70 anos	16	32,7
	≥ 70 anos e < 80 anos	12	24,5
	≥ 80 anos	17	34,7
<b>Localização do Tumor</b>	Ângulo esplénico do Cólon	2	4,1
	Ângulo hepático do Cólon	5	10,2
	Cólon Ascendente	18	36,7
	Cólon Descendente	3	6,1
	Cólon Sigmoides	17	34,7
	Cólon Transverso	4	8,2
<b>Género</b>	Masculino	26	46,9
	Feminino	23	53,1
<b>Índice de Massa Corporal (IMC)</b>	Abaixo do normal (<18,5)	0	0
	Normal (≥18,5 e <25)	18	36,7
	Excesso de peso (≥25 e <30)	25	51,0
	Obesidade (≥30)	6	12,2
<b>Tipo de Cirurgia</b>	Colectomia total	2	4,1
	Hemicolectomia direita	26	53,1
	Hemicolectomia esquerda	15	30,6
	Receção anterior do reto	6	12,2
<b>Sobrevivência pós cirúrgica</b>	Vivos	35	71,4
	Falecidos	6	12,2

## **4.2 Imunohistoquímica**

### **4.2.1 Controlo Tecidular**

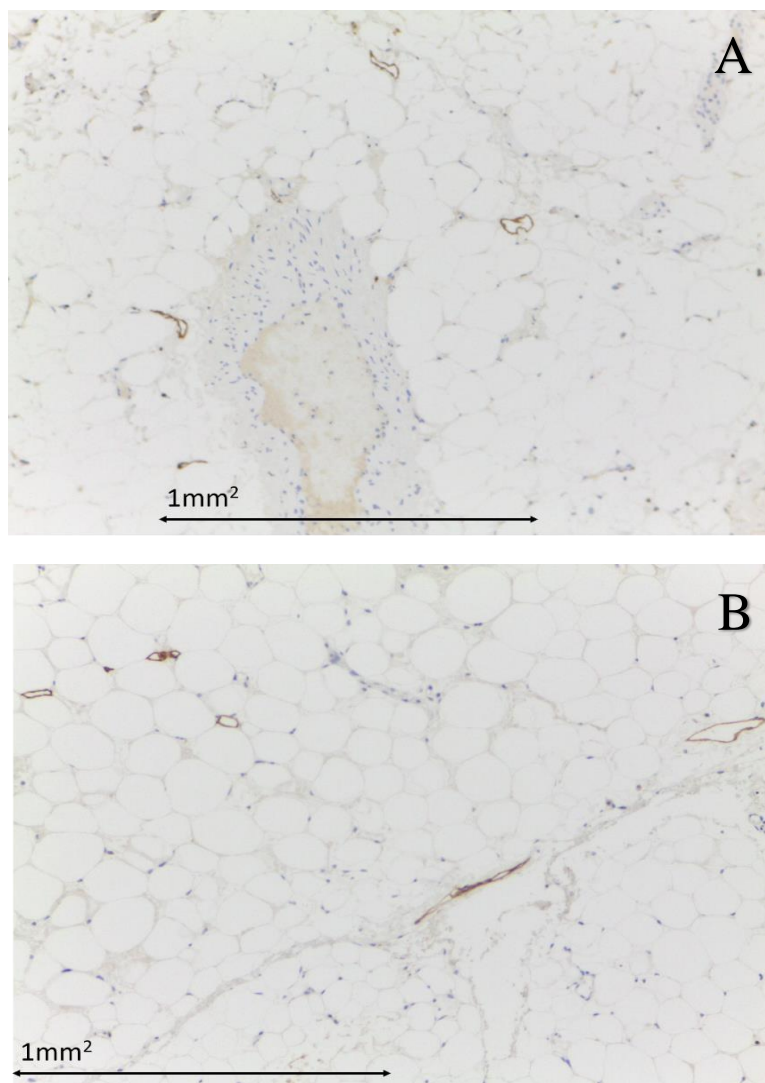
O controlo tecidular de amígdala utilizado demonstrou uma boa marcação de vasos linfáticos (figura 4.1) garantido assim a qualidade da imunohistoquímica realizada.



**Figura 4.1** - Controlo tecidular de amígdala utilizado na imunohistoquímica. (IHQ, ampliação 10x)

### **4.2.2 Densidade Linfática nos adenocarcinomas do cólon**

Dos 49 casos de ADC do cólon analisados por imunohistoquímica apenas 4 casos não apresentaram qualquer tipo de marcação linfática positiva nem nas regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor. Considerou-se apenas a marcação dos vasos linfáticos em zonas de tecido adiposo (camada serosa e subserosa) sendo descartados os vasos linfáticos marcados nas mucosas. A distribuição dos vasos linfáticos foi semelhante em áreas mesentéricas de regiões peritumorais e distais ao tumor (figura 4.2).

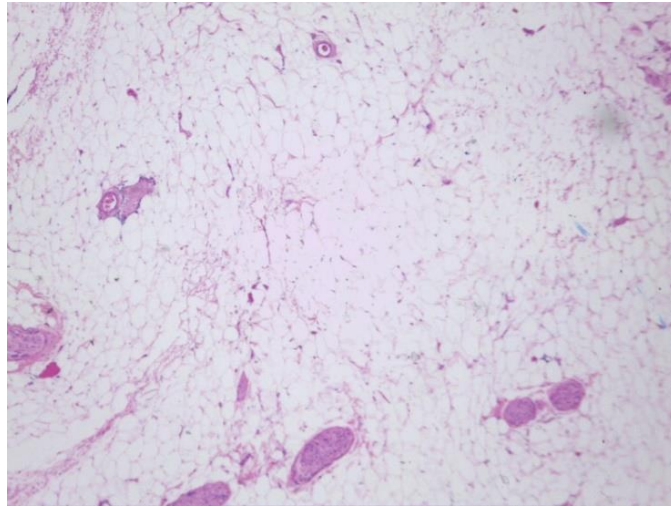


**Figura 4.2** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina realizada em regiões peritumorais (A) e em regiões distais ao tumor (B). (IHQ, ampliação 10x).

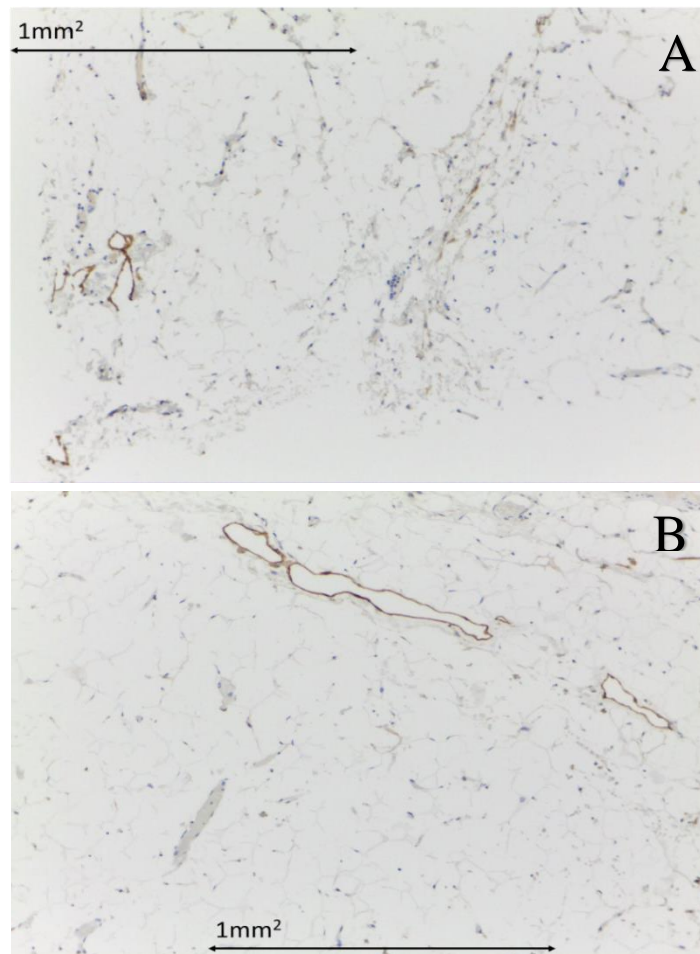
#### **4.2.2.1 Densidade Linfática nas secções mesentéricas peritumorais**

Da análise histopatológica realizada através das lâminas de hematoxilina-eosina coradas no SAP do HFF verificou-se a presença de grandes áreas de gordura, com estruturas vasculares e sanguíneas de grande dimensão (figura 4.3) o que nos sugeria uma grande probabilidade de que, no momento da realização da técnica de imunohistoquímica, houvesse uma abundante marcação positiva de vasos linfáticos, uma vez que é frequente a presença de vasos linfáticos na proximidade de vasos sanguíneos. Nas figuras 4.4 a 4.8, é possível ver o resultado das imunohistoquímicas realizadas nas secções mesentéricas peritumorais em estudo. Verifica-se que há a presença de vasos linfáticos tanto na forma luminal (estrela vermelha da figura 4.6) como na forma linear (seta da figura 4.6). Para

além disso, verifica-se que é tão fácil encontrar vasos linfáticos marcados positivamente em amostras do género masculino (figura 4.4 A) como do género feminino (figura 4.4 B).

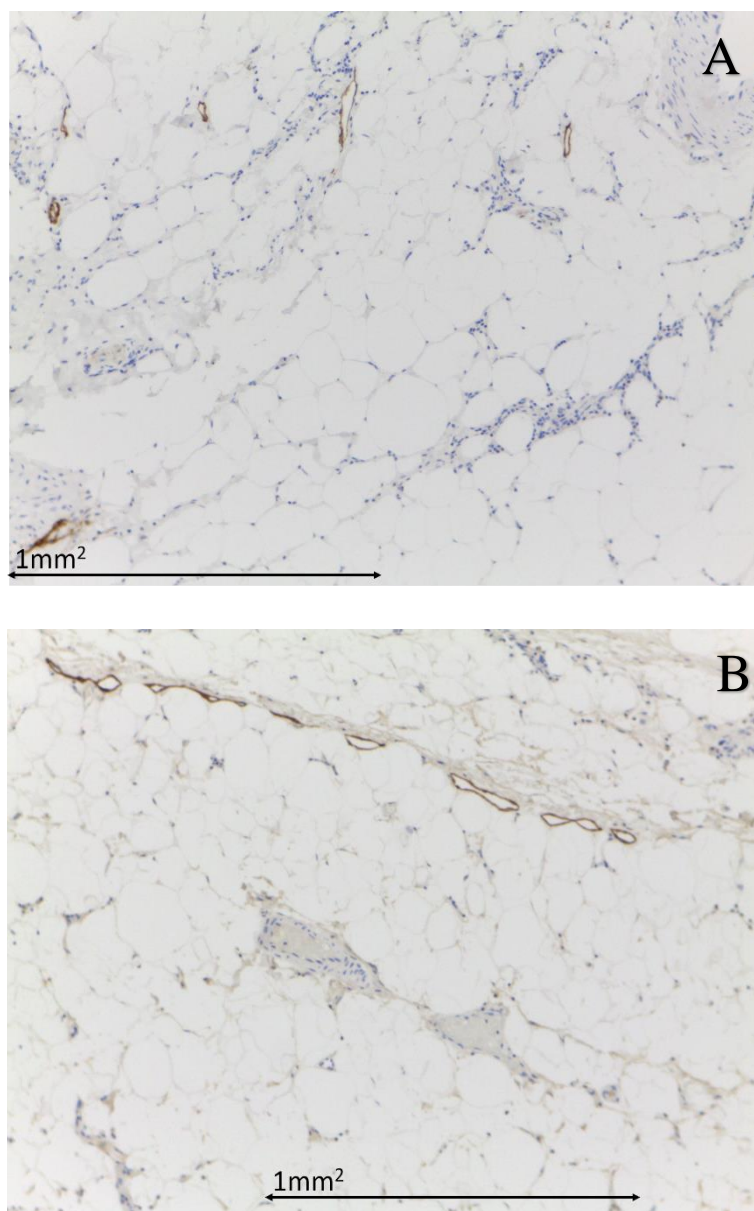


**Figura 4.3** - Lâmina corada com hematoxilina-eosina no serviço de Anatomia patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca. É visível uma imensa área de tecido adiposo, mas também estruturas sanguíneas de grande dimensão. (Ampliação 4x).

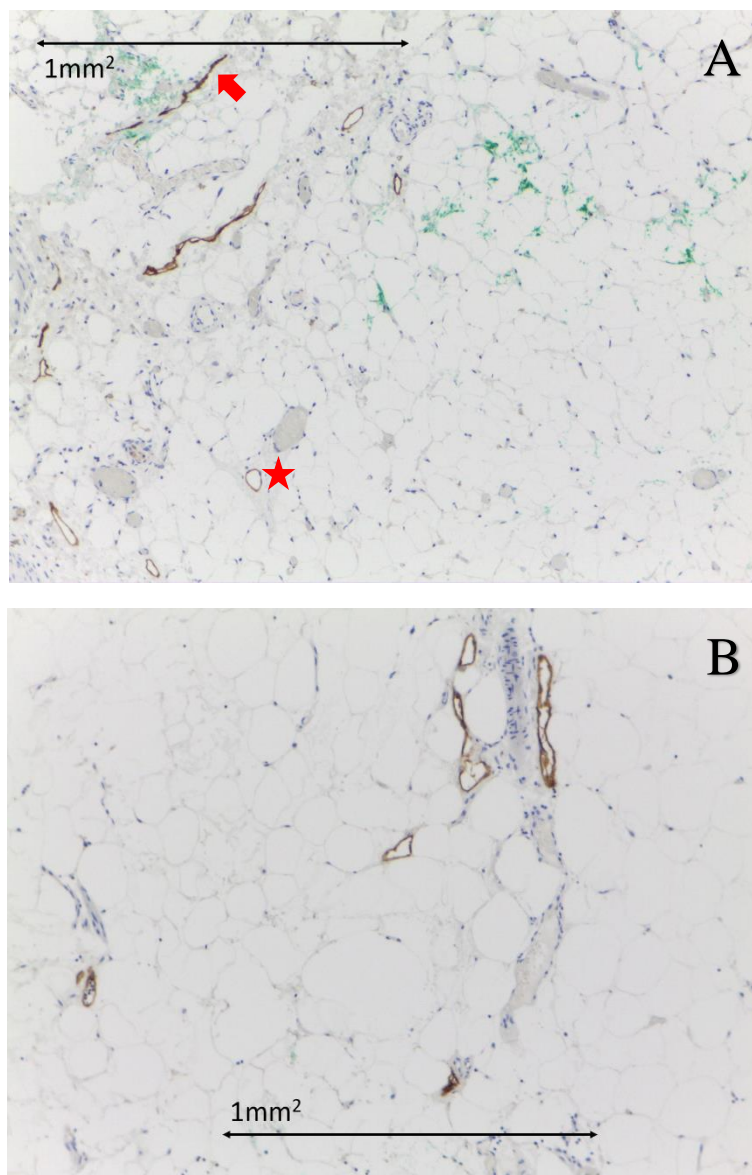


**Figura 4.4** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon do género masculino (A) e caso de adenocarcinoma do cólon do género feminino (B). (IHQ, ampliação 10x).

Aparentemente, também o estadió pTMN não parece ser um fator relevante pois facilmente se encontram amostras em estadió pT diferentes e com igual número de vasos linfáticos por  $1\text{mm}^2$  (figura 4.5), embora também se trate de amostras de regiões anatómicas diferentes. Relativamente à variável IMC verifica-se que, é possível encontrar amostras (entre os 49 casos de ADC do cólon estudados) em que num  $\text{IMC} < 25$  se encontram marcações de vasos linfáticos superiores (aproximadamente em dobro) (figura 4.6 A) comparativamente com amostras em que o IMC é  $\geq 25$ , (figura 4.6 B) daí que seja uma variável importante de avaliar estatisticamente.

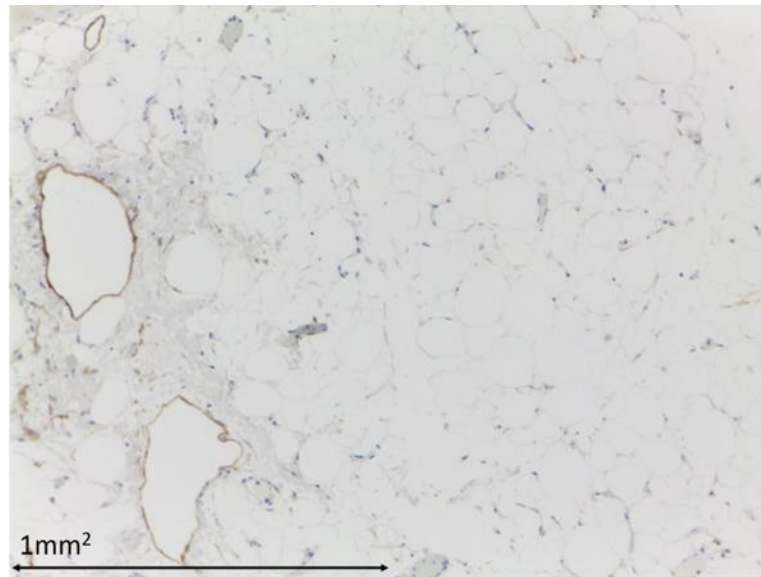


**Figura 4.5** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon em estadió pT2 (A) e caso de adenocarcinoma do cólon em estadió pT3 (B). (IHQ, ampliação 10x).



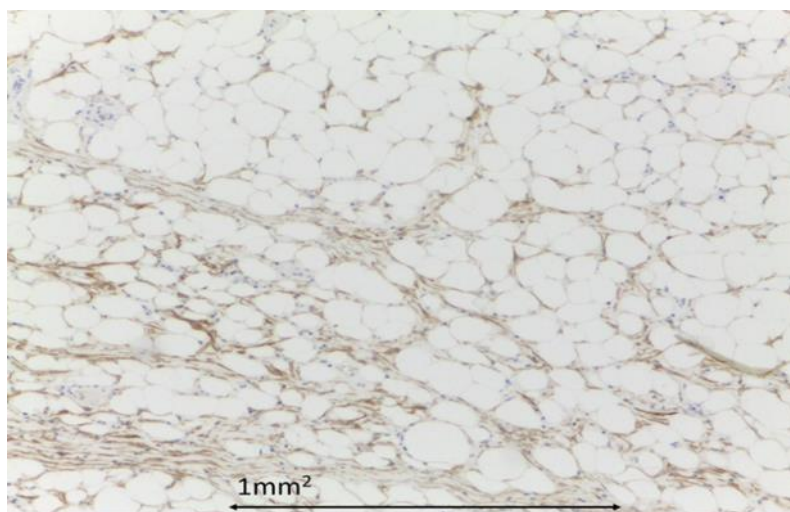
**Figura 4.6** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon com índice de massa corporal <25 (A) e caso de adenocarcinoma com índice de massa corporal  $\geq 25$  (B). (IHQ, ampliação 10x).

Quanto à variável idade, parece relativamente fácil encontrar o mesmo número de vasos linfáticos marcados em amostras cujas idades são muito díspares, nomeadamente, identificação de 3 vasos linfáticos por  $1\text{mm}^2$  em amostras cujas idades são <60 anos (figura 4.4 B) e em amostras cujas idades são superiores a 80 anos. (figura 4.7). Esta variável foi, posteriormente, analisada estatisticamente.



**Figura 4.7** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon com idade inferior a 60 anos. (IHQ, ampliação 10x).

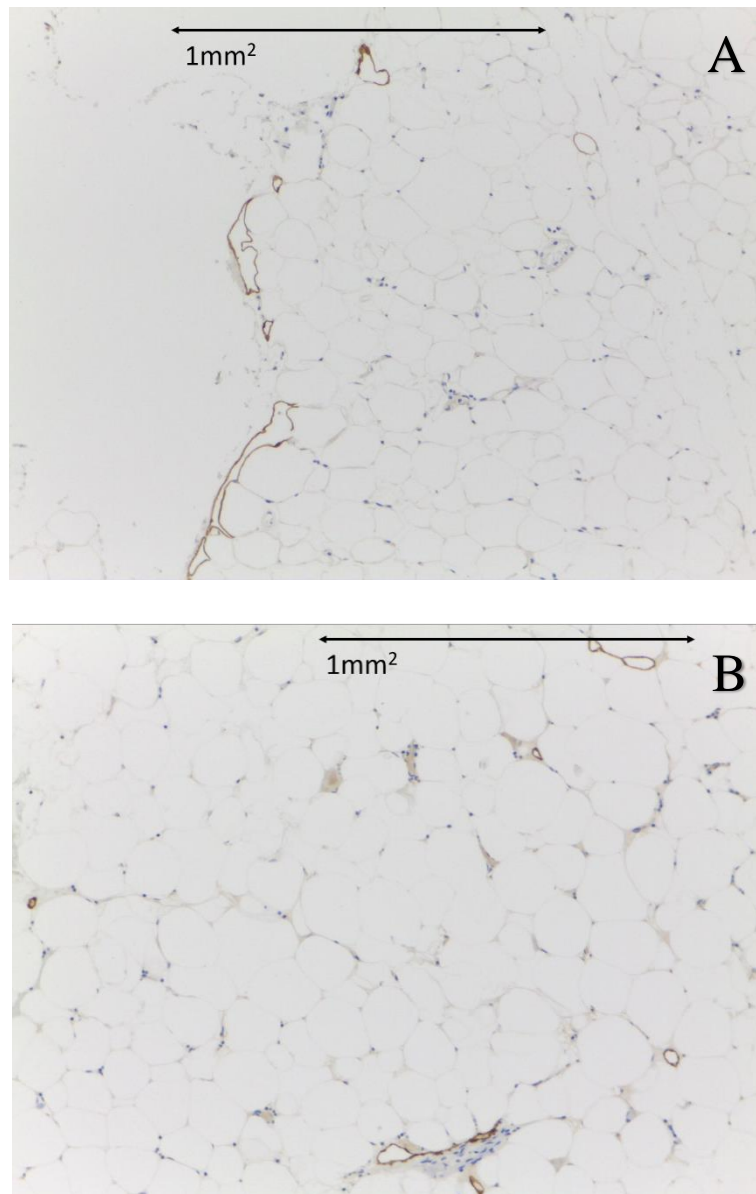
Durante a revisão das lâminas de imunohistoquímica verificou-se um caso especial (entre os 49 casos de ADC do cólon estudados), onde nesta região peritumoral, houve uma marcação exacerbada pelo anticorpo D2-40 da podoplanina (figura 4.8). Embora a marcação tenha sido visivelmente aumentada relativamente aos restantes casos analisados é possível também verificar que, os vasos marcados não são bem definidos, espaçados e fáceis de quantificar tal como acontecia nos outros 48 casos de regiões peritumorais de ADC do cólon estudadas.



**Figura 4.8** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon com marcação incomum. (IHQ, ampliação 10x).

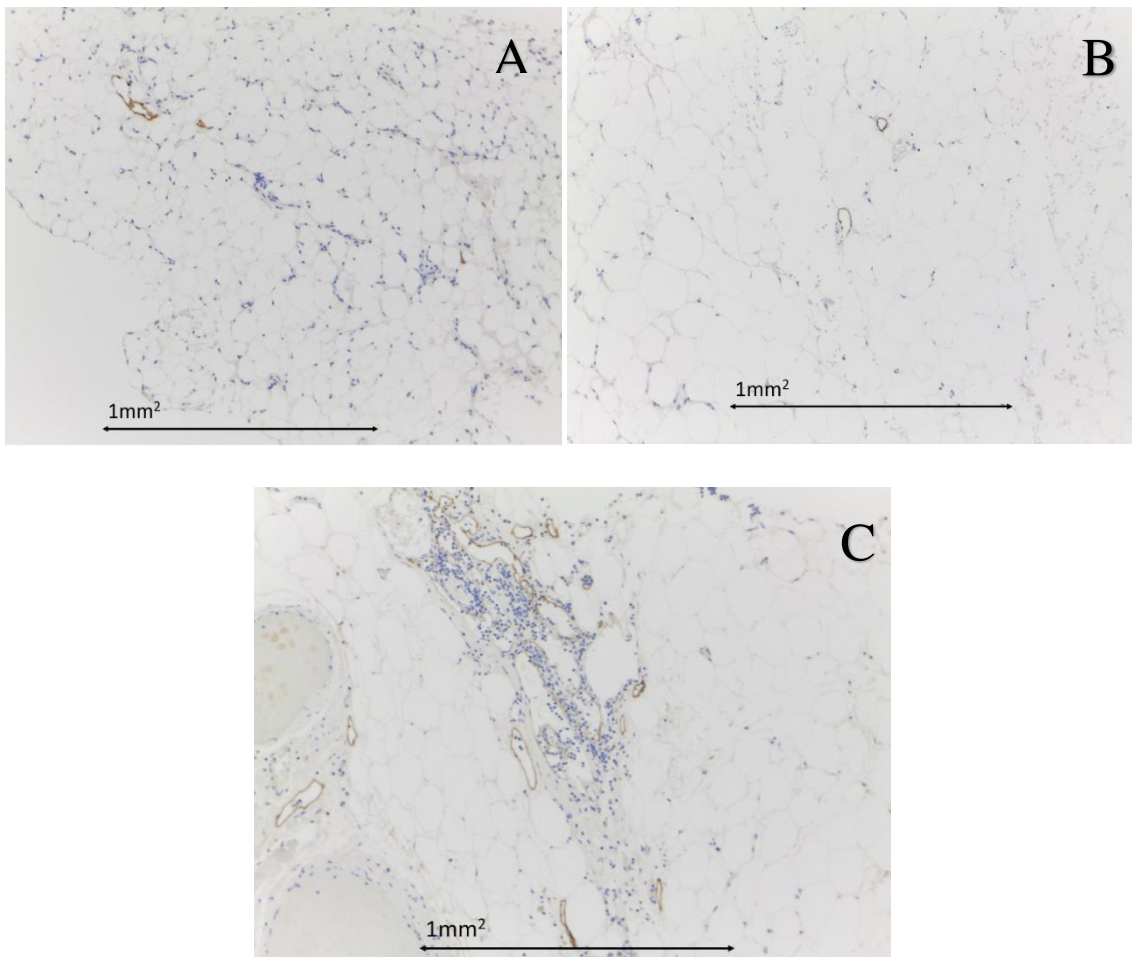
#### **4.2.2.2 Densidade Linfática nas secções mesentéricas distais ao tumor**

A densidade e distribuição linfática nesta região mesentérica é semelhante à região mesentérica peritumoral, anteriormente descrita. Também aqui houve marcação de vasos linfáticos com forma luminal e como forma linear. Relativamente à variável género, verifica-se, também neste caso, que aparentemente é pouco relevante uma vez que, é tão fácil encontrar vasos linfáticos marcados positivamente em amostras derivadas de doentes do género masculino (figura 4.9 A) como do género feminino (figura 4.9 B). No entanto, só podemos descurar a variável género após a sua análise estatística.



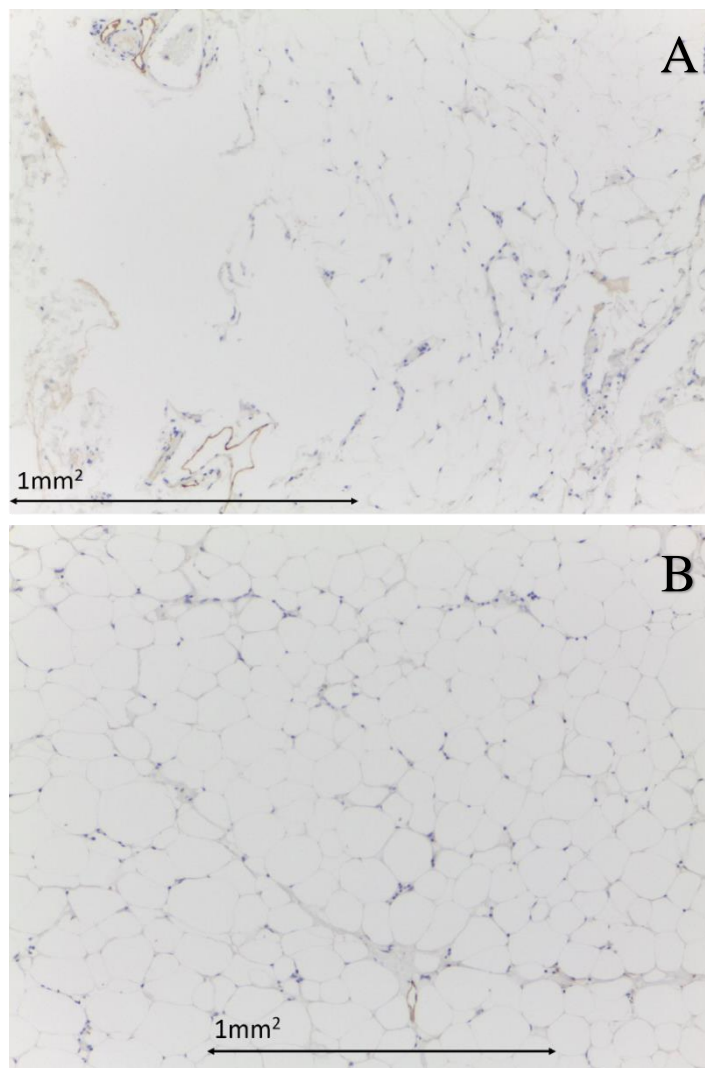
**Figura 4.9** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon, região distal ao tumor, do género masculino (A) e caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, do género feminino (B). (IHQ, ampliação 10x).

Em relação ao estadiopTNM fica a dúvida quanto à sua importância na densidade linfática de regiões distais ao tumor uma vez que, é possível encontrar amostras em estadios pT diferentes e com igual número de vasos linfáticos por  $1\text{mm}^2$  (figura 4.10 A e B), mas também amostras em estadios pT iguais (bem como em áreas anatómicas equivalentes) e com uma marcação positiva de vasos linfáticos bastante díspar (figura 4.10 A e C). Relativamente à variável IMC, esta apresenta-se como um fator potencial uma vez que, a amostra (entre os 49 ADC do cólon em estudo) onde o IMC foi mais baixo não demonstrou qualquer marcação positiva de vasos linfáticos, no entanto, pelo contrário a amostra com um IMC maior (IMC de 40,1) teve uma marcação de 9 vasos linfáticos por  $1\text{mm}^2$  (figura 4.10 C).



**Figura 4.10** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon, em região distal ao tumor, estadiopT2, com pouca marcação de vasos linfáticos (A); caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, em estadiopT3 (B); caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, em estadiopT2 com maior marcação de vasos linfáticos (C). (IHQ, ampliação 10x).

Relativamente à variável idade, esta não parece ser relevante uma vez que, ao contrário do que era previsível, é possível encontrar amostras em que, em idades menores de diagnóstico (<50 anos) houve uma maior marcação de vasos linfáticos comparativamente com amostras de idades superiores (>80 anos), apesar de ambos os casos se encontrarem no mesmo estadio (pT3) (figura 4.11).



**Figura 4.11** - Imunohistoquímica com anticorpo D2-40 da podoplanina. Caso de adenocarcinoma do cólon, em região distal ao tumor, com idade inferior a 50 anos (A) e caso de adenocarcinoma do cólon, distal ao tumor, com idade superior a 80 anos. (IHQ, ampliação 10x).

### **4.3 Análise das características clínico-histológicas**

Para os 49 casos de adenocarcinoma do cólon em estudo foi ainda verificado a possível influência que as características clínico-histológicas descritas nas tabelas 4.2 a 4.5 podiam ter na densidade linfática mesentérica peritumoral e na densidade linfática mesentérica numa região mais distal ao tumor. Foram analisadas as características

tamanho do tumor e o perímetro por ele ocupado na tabela 4.2 e na tabela 4.3, respectivamente, sendo o tamanho médio dos tumores analisados de 4,4cm e a média do perímetro que o tumor ocupa de 77,4%. Foi ainda estudado o número de gânglios linfáticos isolados na tabela 4.4 verificando-se que, em média, foram isolados 30 gânglios, no entanto, o número máximo de gânglios positivos não ultrapassou os 5.

**Tabela 4.2** - Análise estatística do tamanho do tumor na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon.

Características	Mínimo (cm)	Máximo (cm)	Média	Desvio Padrão
Tamanho do tumor	1,5	15,0	4,4	2,7

**Tabela 4.3** - Análise estatística do perímetro ocupado pelo tumor na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon.

Características	Mínimo (%)	Máximo (%)	Média	Desvio Padrão
Perímetro ocupado pelo tumor	10	100	77,4	26,3

**Tabela 4.4** - Análise estatística do número de gânglios linfáticos isolados e do número de gânglios linfáticos positivos na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon.

Características	Mínimo (n)	Máximo (n)	Média	Desvio Padrão
Nº Gânglios isolados	10	62	30,0	13,2
Nº Gânglios positivos	0	5	0,53	1,1

As outras características clínico-histológicas analisadas tais como o estadiopTNM, as invasões e infiltrações, o grau de diferenciação, a presença de padrão mucinoso, de *budding* e a integridade do mesocólon estão descritas na tabela 4.5. Quanto às invasões perineural e linfovascular, verifica-se que não estão presentes na maioria das amostras uma vez que as percentagens de ausência de invasão foram, respectivamente, de 93,9% e de 75,5%. Relativamente à infiltração linfocítica intratumoral 23/49 dos casos analisados não apresentava qualquer nível de infiltração. Por outro lado, em referência à infiltração linfocítica peritumoral, 21/49 casos apresentaram um nível de infiltração moderado. Quanto à presença ou ausência do padrão mucinoso, verificou-se que a grande maioria dos casos em estudo (69,4%) não apresentava este padrão. Em 59,2% das amostras em análise o mesocólon apresentou-se íntegro. A presença de *budding* tumoral ocorreu na generalidade da amostra (34/49). Quanto ao grau histológico também a maioria dos doentes possuía um grau moderadamente diferenciado do tumor (63,3%). Dos 49 casos

de adenocarcinoma do cólon em estudo apenas existiam estadios T2 e T3 com clara predominância do estadio T3 (75,5%). A maioria dos casos não apresentavam envolvimento dos gânglios linfáticos (73,5%) nem metástases à distância (89,9%).

**Tabela 4.5** - Análise estatística de diversas características clínico-histológicas: estadio pTNM, invasões e infiltrações tumorais, grau de diferenciação tumoral, presença de padrão mucinoso, presença de *budding* tumoral e integridade do mesocólon.

Características		Frequência (n)	Porcentagem (%)
<b>Infiltrado Peritumoral</b>	Ausente	5	10,2
	Ligeiro	8	16,3
	Moderado	21	42,9
	Marcado	14	28,6
	<b>Valores Válidos</b>	48	98,0
	<b>Valores Ausentes</b>	1	2,0
<b>Infiltrado Intratumoral</b>	Ausente	23	46,9
	Ligeiro	12	24,5
	Moderado	7	14,3
	Marcado	4	8,2
	<b>Valores Válidos</b>	46	93,9
	<b>Valores Ausentes</b>	3	6,1
<b>Integridade do Mesocólon</b>	Não Integro	15	30,6
	Integro	29	59,2
	<b>Valores Válidos</b>	44	89,8
	<b>Valores Ausentes</b>	5	10,2
<b>Grau de Diferenciação</b>	Bem diferenciado	12	24,5
	Moderadamente diferenciado	31	63,3
	Pouco diferenciado	4	8,2
	<b>Valores Válidos</b>	47	95,9
	<b>Valores Ausentes</b>	2	4,1
<b>Invasão Perineural</b>	Não	46	93,9
	Sim	3	6,1
<b>Invasão Linfovascular</b>	Não	37	75,5
	Sim	12	24,5
<b>Padrão Mucinoso</b>	Não	34	69,4
	Sim	15	30,6
<b>Presença de <i>Budding</i></b>	Não	15	30,6
	Sim	34	69,4
<b>Estadios pTNM</b>	T2	12	24,5
	T3	37	75,5
	N0	36	73,5
	N positivos	13	26,5
	M0	44	89,8
	M positivos	5	10,2

**Nota:** No estadiamento pTNM, a denominação “N positivos” significa que houve envolvimento dos gânglios linfáticos e a “M positivos” indica que houve presença de metástases à distância não descrevendo, no entanto, o número mínimo e máximo de gânglios e metástases, respetivamente, afetados.

#### 4.4 Análise estatística da densidade linfática

Podemos verificar através da análise da tabela 4.6 que, a média do número de vasos linfáticos mesentéricos peritumorais por  $1\text{mm}^2$  é ligeiramente maior que a média dos vasos linfáticos presentes na região mais distal ao tumor. No entanto, também o desvio padrão é mais elevado no caso dos vasos linfáticos peritumorais inferindo-se, assim, que não existe diferença estatística significativa ( $p=0.294$ ) entre a média do número de vasos linfáticos peritumorais e distais (tabela 4.7).

**Tabela 4.6** - Análise estatística da densidade linfática peritumoral Vs densidade linfática distal ao tumor.

Densidade Linfática por $1\text{mm}^2$	n	Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	49	2,49	3,202	,457
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	49	2,33	2,014	,288

**Tabela 4.7** - Significância estatística entre a densidade linfática peritumoral e a densidade linfática distal ao tumor em adenocarcinomas do cólon.

	Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Entre Grupos	75,304	6	12,551	1,264	,294
Nos grupos	416,940	42	9,927		

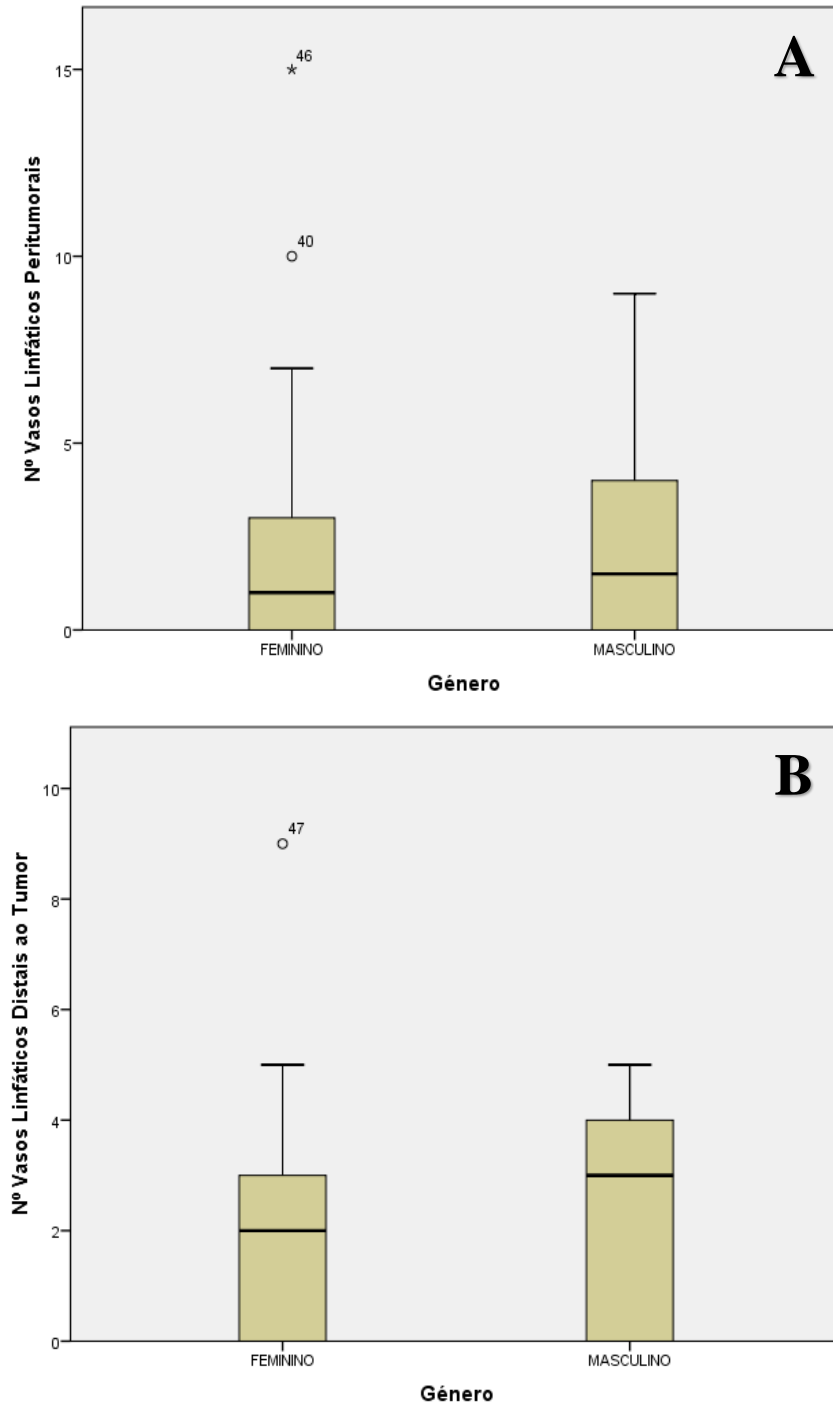
##### 4.4.1 Análise da influência das diferentes variáveis de estudo na densidade linfática de adenocarcinomas do cólon

###### 4.4.1.1 Influência da variável “género” na densidade linfática

Podemos verificar, através da tabela 4.8 que, a densidade linfática, por  $1\text{mm}^2$ , na região peritumoral é ligeiramente maior no género feminino do que no género masculino embora o desvio padrão também seja maior. Assim sendo, através da tabela 4.9 podemos comprovar que a variável género não têm influência estatisticamente significativa na densidade linfática peritumoral dos 49 casos de adenocarcinoma do cólon analisados uma vez que, para um intervalo de confiança de 95% a significância associada ao teste foi superior a 0,05.

Ainda na tabela 4.8 podemos constatar que, no que diz respeito à densidade linfática, por  $1\text{mm}^2$ , na região mais distal ao tumor ocorre precisamente o oposto e a média dos linfáticos é ligeiramente maior no género masculino. Quanto ao desvio padrão, neste caso,

é menor. Estes dados podem ser ainda facilmente verificados nos diagramas de caixa representados na figura 4.12. Na tabela 4.9 consegue-se provar que a variável género também não exerce efeito estatisticamente significativo na densidade linfática das regiões distais ao tumor analisadas neste estudo.



**Figura 4.12** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o género feminino/masculino.

**Tabela 4.8** - Análise estatística da variável género na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Feminino	23	2,65	3,797	,792	1,01	4,29	0	15
	Masculino	26	2,35	2,637	,517	1,28	3,41	0	9
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Feminino	23	2,30	2,225	,464	1,34	3,27	0	9
	Masculino	26	2,35	1,853	,363	1,60	3,09	0	5

**Tabela 4.9** - Significância estatística da variável género na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

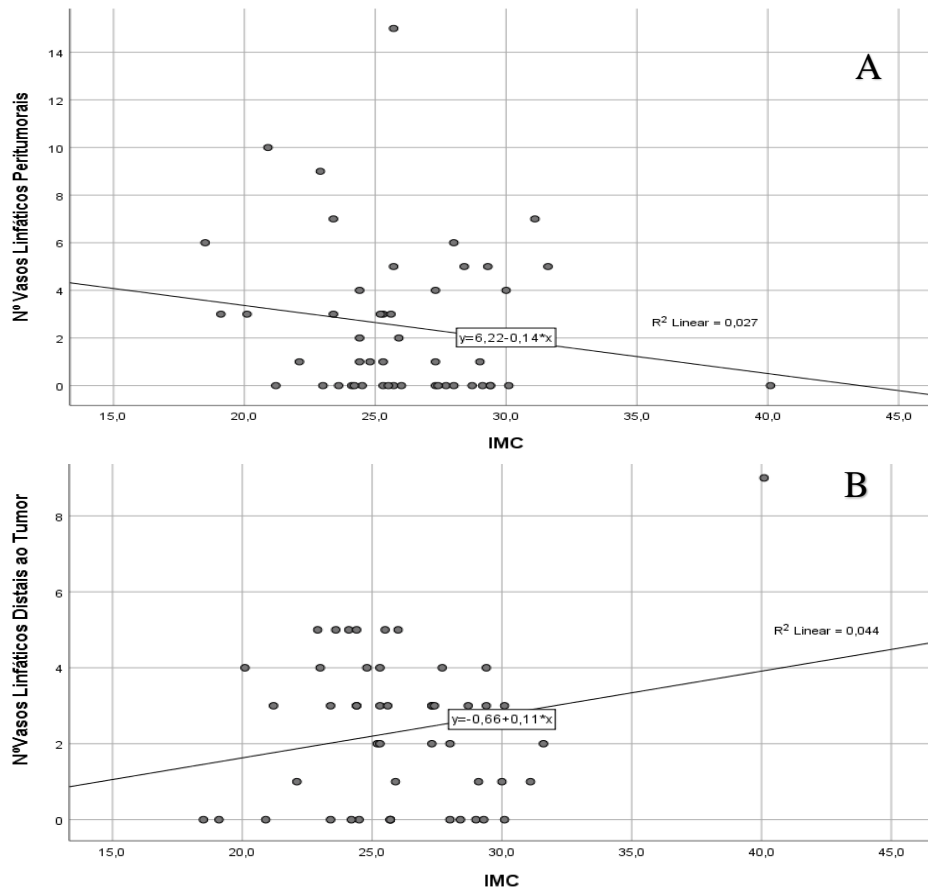
		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	1,143	1	1,143	,109	,742
	Nos grupos	491,102	47	10,449		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	,021	1	,021	,005	,943
	Nos grupos	194,754	47	4,144		

#### 4.4.1.2 Influência da variável “Índice de Massa Corporal (IMC)” na densidade linfática

A tabela 4.10 mostra que, a variável IMC, na região peritumoral, não exerce influência estatística significativa na densidade linfática. Contrariamente, o índice de massa corporal parece influenciar a densidade linfática por  $1\text{mm}^2$ , nas regiões mais distais ao tumor, uma vez que, para um intervalo de confiança de 95% a significância associada ao teste foi inferior 0,05. Pelos gráficos de dispersão da figura 4.13 B, verifica-se que, na região distal ao tumor, quanto mais elevado é o IMC, maior o número de vasos linfáticos presentes.

**Tabela 4.10** - Significância estatística da variável IMC na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	329,578	36	9,155	,675	,823
	Nos grupos	162,667	12	13,556		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	177,942	36	4,943	3,524	,012
	Nos grupos	16,833	12	1,403		



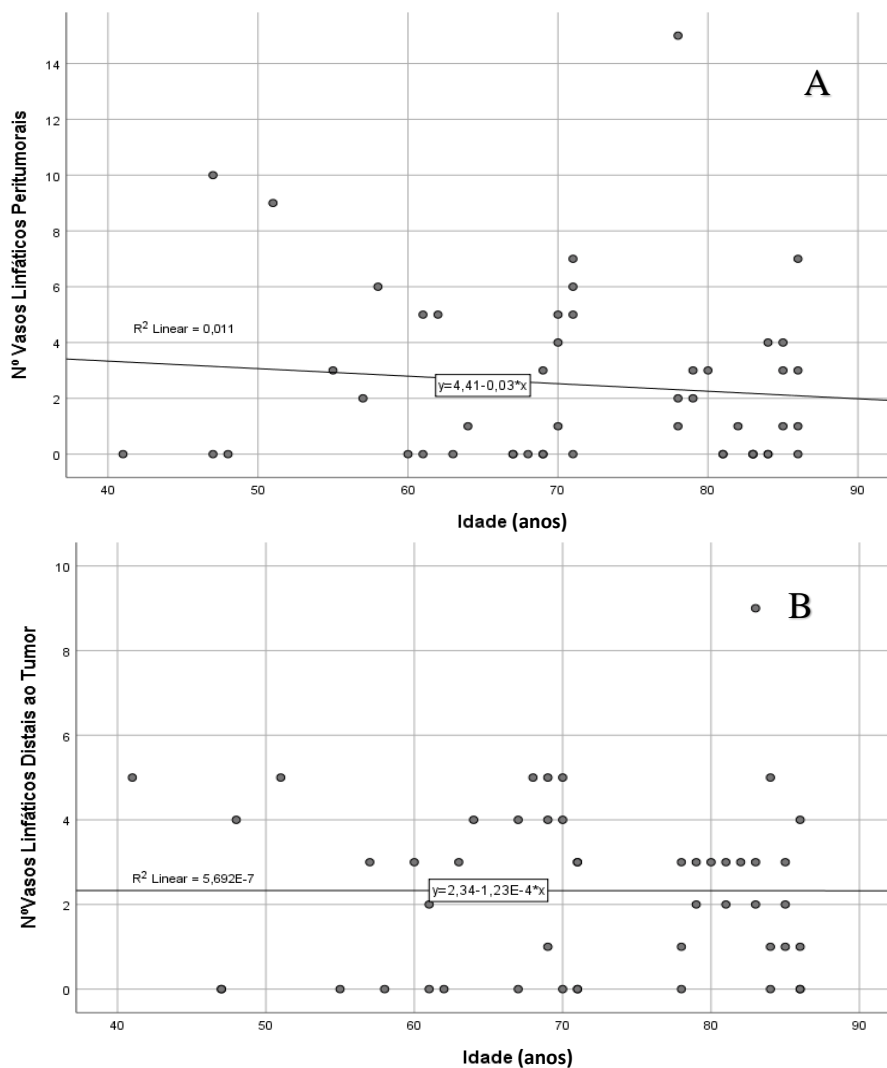
**Figura 4.13** - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por  $1\text{mm}^2$ , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o IMC.

#### 4.4.1.3 Influência da variável “idade” na densidade linfática

É possível concluir, através da tabela 4.11 que, a variável idade, não tem intervenção estatisticamente significativa, para um intervalo de confiança de 95%, nem na densidade linfática, por 1mm<sup>2</sup>, da região peritumoral nem nas regiões mais distais ao tumor, nos 49 casos de adenocarcinoma do cólon analisados. Estes resultados podem ser facilmente visualizados nos gráficos de dispersão da figura 4.14.

**Tabela 4.11** - Significância estatística da variável idade na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	219,495	25	8,780	,740	,769
	Nos grupos	272,750	23	11,859		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	92,026	25	3,681	,824	,683
	Nos grupos	102,750	23	4,467		



**Figura 4.14** - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a variável idade.

Assim, da análise estatística realizada às possíveis variáveis de confundimento (IMC, idade e gênero) infere-se que, estas não são fatores de interferência na densidade linfática das amostras de adenocarcinoma de cólon em estudo. A única variável que poderá de facto estar a interferir é o IMC mas apenas no caso da densidade linfática em regiões mais distais ao tumor onde no teste ANOVA houve significância para um grau de confiança de 95% (tabela 4.10).

#### **4.4.1.4 Influência da variável “estadiamento pTNM” na densidade linfática**

A possível influência do estadiamento pTNM na densidade linfática mesentérica peritumoral e na densidade linfática mesentérica numa região mais distal ao tumor está descrita nas tabelas 4.12 a 4.19. Na tabela 4.12 é possível verificar que, quanto à profundidade de invasão na parede (pT) a densidade linfática peritumoral, por  $1\text{mm}^2$ , é maior (2,86) em adenocarcinomas do cólon T3 embora o desvio padrão seja também maior. É possível aferir ainda, nesta mesma tabela que, pT tem uma influência contrária na densidade linfática em regiões mais distais ao tumor, visto que, neste caso, os ADC do cólon T2 possuem maior densidade linfática. Na tabela 4.13, pode-se verificar que pT não exerce efeito estatístico significativo na densidade linfática mesentérica peritumoral, no entanto é uma variável que tem significância estatística ( $p=0,011$ ) na densidade linfática mesentérica numa região mais distal ao tumor. Estes resultados estão ainda representados nos diagramas de caixa da figura 4.15.

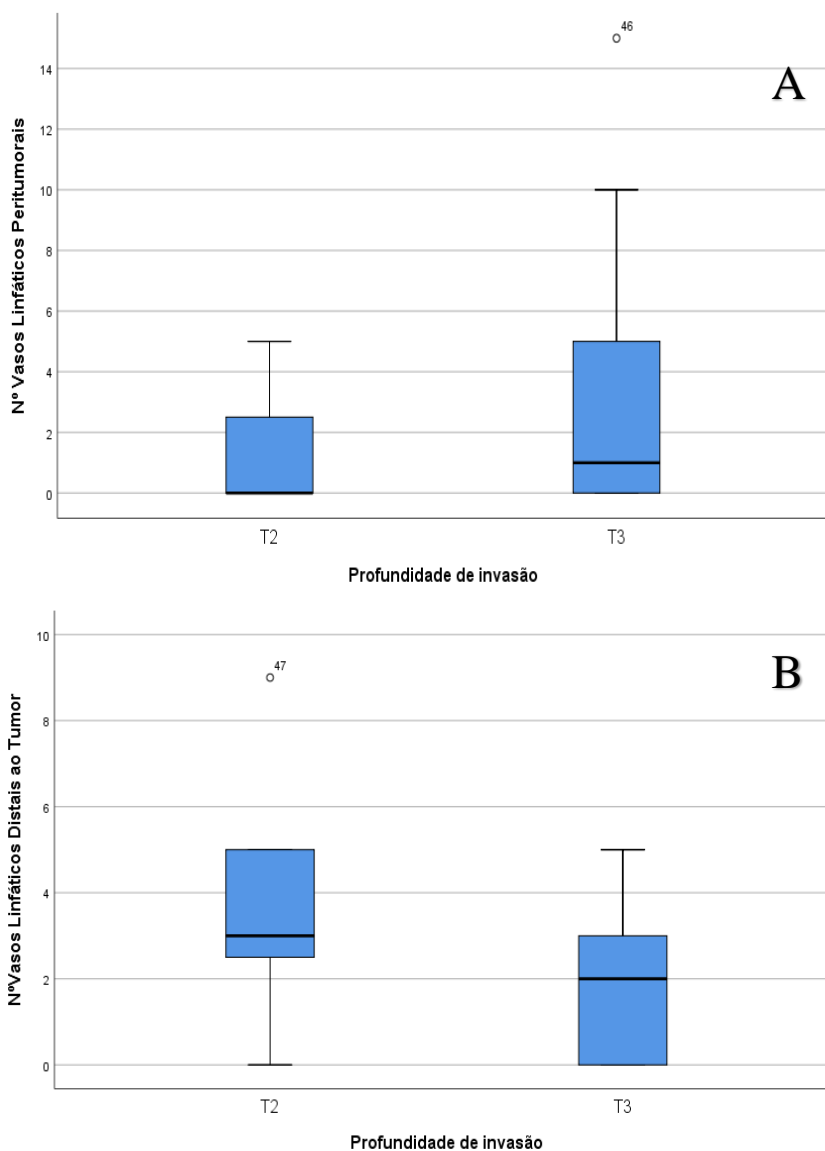
Relativamente ao envolvimento de gânglios linfáticos (pN) e a sua possível influência na densidade linfática, é possível verificar na tabela 4.14 que, a ausência de gânglios linfáticos invadidos faz com que a densidade linfática por  $1\text{mm}^2$ , seja superior tanto nas regiões distais ao tumor como em regiões peritumorais nos casos de ADC do cólon em estudo. Na tabela 4.15, adquirida no programa SPSS através da funcionalidade teste-t para amostras independentes, confirma-se, através do teste de Levene, a homogeneidade das variâncias, uma vez que a significância associada ao teste, tanto para regiões distais ao tumor como para as regiões peritumorais foi superior a 0,05. Assumindo assim a igualdade das variâncias é possível aferir que, pN não exerce efeito estatístico significativo na densidade linfática mesentérica peritumoral ( $p=0,814$ ). No entanto, é uma variável que tem significância estatística ( $p=0,004$ ) na densidade linfática mesentérica numa região mais distal ao tumor. Estes resultados estão ainda representados nos diagramas de caixa da figura 4.16.

**Tabela 4.12** - Análise estatística da variável estadiamento pT na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		n	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	T2	12	1,33	1,826	,527	,17	2,49	0	5
	T3	37	2,86	3,473	,571	1,71	4,02	0	15
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	T2	12	3,58	2,234	,645	2,16	5,00	0	9
	T3	37	1,92	1,785	,294	1,32	2,51	0	5

**Tabela 4.13** - Significância estatística da variável estadiamento pT na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	21,254	1	21,254	2,121	,152
	Nos grupos	470,991	47	10,021		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	25,102	1	25,102	6,953	,011
	Nos grupos	169,673	47	3,610		



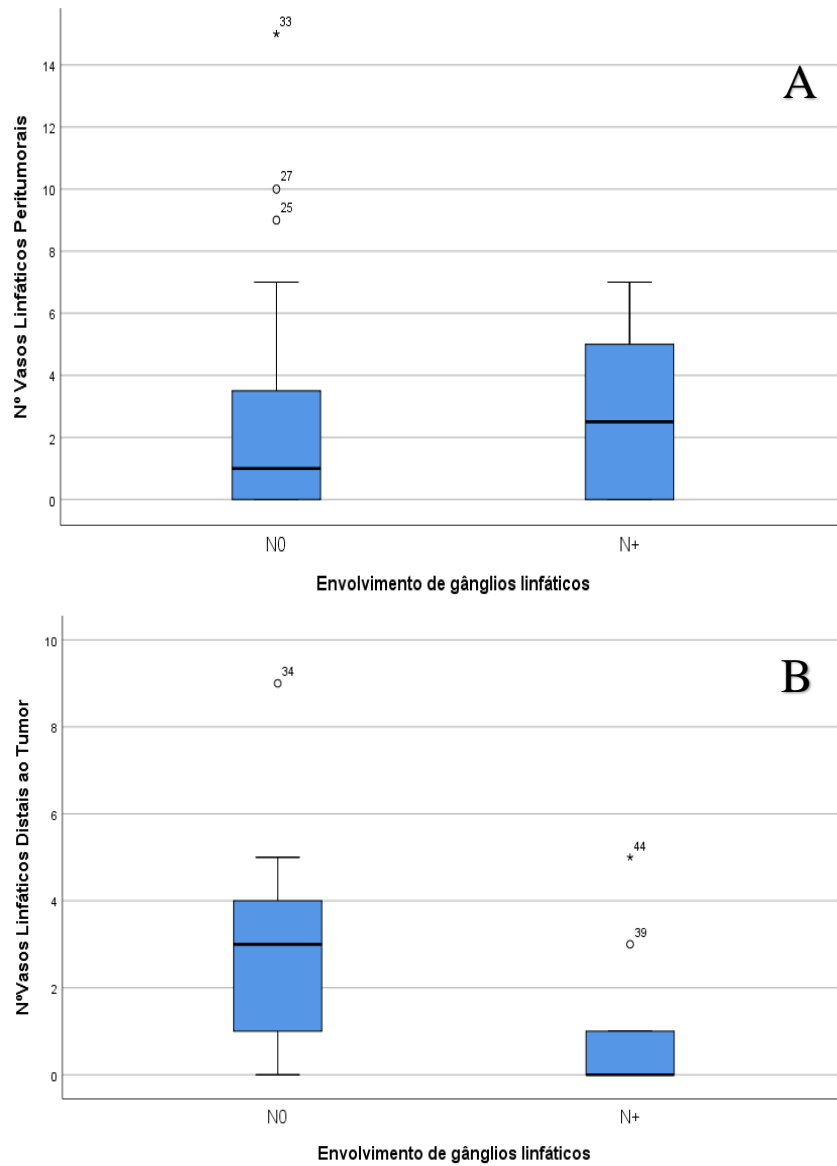
**Figura 4.15** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o grau de invasão à parede (pT).

**Tabela 4.14** - Análise estatística da variável estadiamento pN na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

	pN	n	Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	N0	36	2,56	3,426	,571
	N+	13	2,31	2,594	,720
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	N0	36	2,81	1,939	,323
	N+	13	1,00	1,633	,453

**Tabela 4.15** - Significância estatística da variável estadiamento pN na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	,224	,638	,237	47	,814	,248	1,047	-1,858	2,353
	Variâncias iguais não assumidas			,270	28,060	,789	,248	,919	-1,634	2,129
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	,351	,557	2,990	47	,004	1,806	,604	,591	3,020
	Variâncias iguais não assumidas			3,245	25,104	,003	1,806	,556	,660	2,951

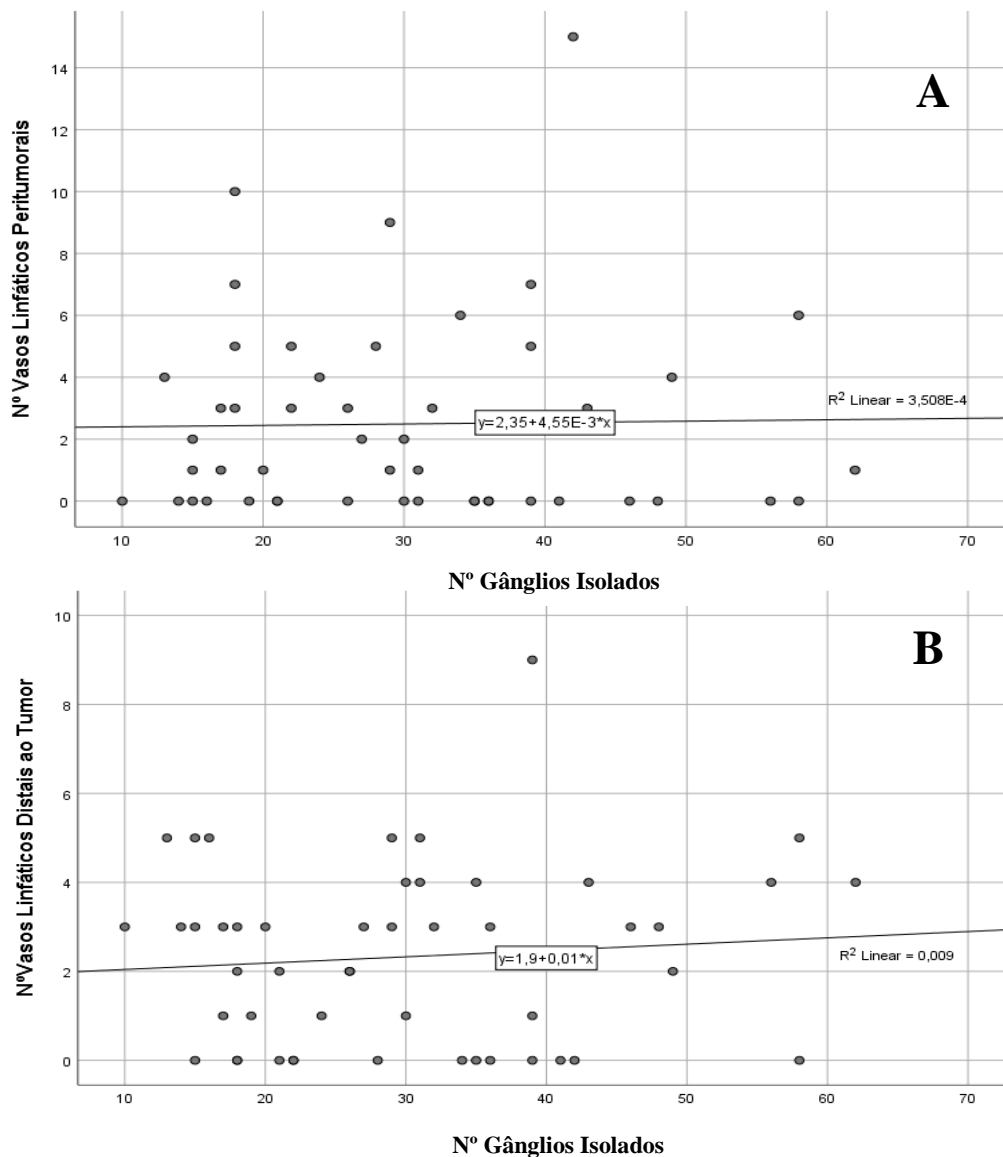


**Figura 4.16** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o envolvimento de gânglios linfáticos (pN).

De forma a melhor analisar, a influência do envolvimento dos gânglios linfáticos na densidade linfática mesentérica, analisou-se o efeito da quantidade de gânglios isolados por tumor. A tabela 4.16 mostra que, a variável quantidade de gânglios isolados não tem poder estatístico significativo, num intervalo de confiança de 95%, nem na densidade linfática, por 1mm<sup>2</sup>, das regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor, nos 49 casos de ADC do cólon analisados. Estes dados podem ainda ser verificados, de forma visual, nos gráficos de dispersão da figura 4.17.

**Tabela 4.16** - Significância estatística da variável quantidade de gânglios linfáticos isolados na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	376,495	31	12,145	1,784	,105
	Nos grupos	115,750	17	6,809		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	90,692	31	2,926	,478	,964
	Nos grupos	104,083	17	6,123		



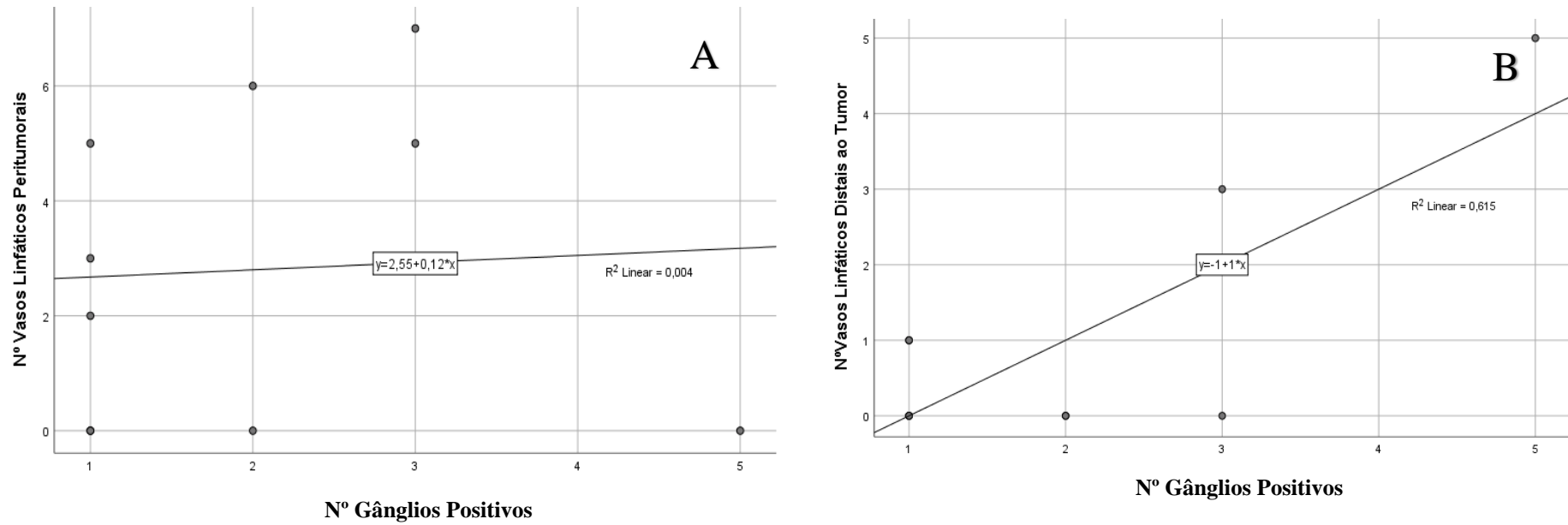
**Figura 4.17** - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o número de gânglios isolados por tumor.

Foi-se ainda analisar a influência da quantidade de gânglios positivos isolados por tumor na densidade linfática mesentérica. Esses resultados foram obtidos através do teste *One-way* ANOVA do SPSS e estão descritos na tabela 4.17. Pode-se verificar nesta tabela que, esta variável não tem poder estatístico na densidade linfática peritumoral dos ADC do cólon estudados, no entanto, exerce poder estatístico ( $p=0,018$ ) na densidade linfática, por  $1 \text{ mm}^2$ , nas regiões mais distais ao tumor analisadas. Estes resultados podem ainda ser verificados, de uma forma mais simples e visual, nos gráficos de dispersão da figura 4.18, onde se confirma que, em regiões distais ao tumor, quanto maior o número de gânglios positivos, maior o número de vasos linfáticos por  $1 \text{ mm}^2$ .

**Tabela 4.17** - Significância estatística da variável quantidade de gânglios linfáticos isolados e positivos na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	10,252	4	2,563	,234	,918
	Nos grupos	481,993	44	10,954		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	45,278	4	11,320	3,332	,018
	Nos grupos	149,497	44	3,398		

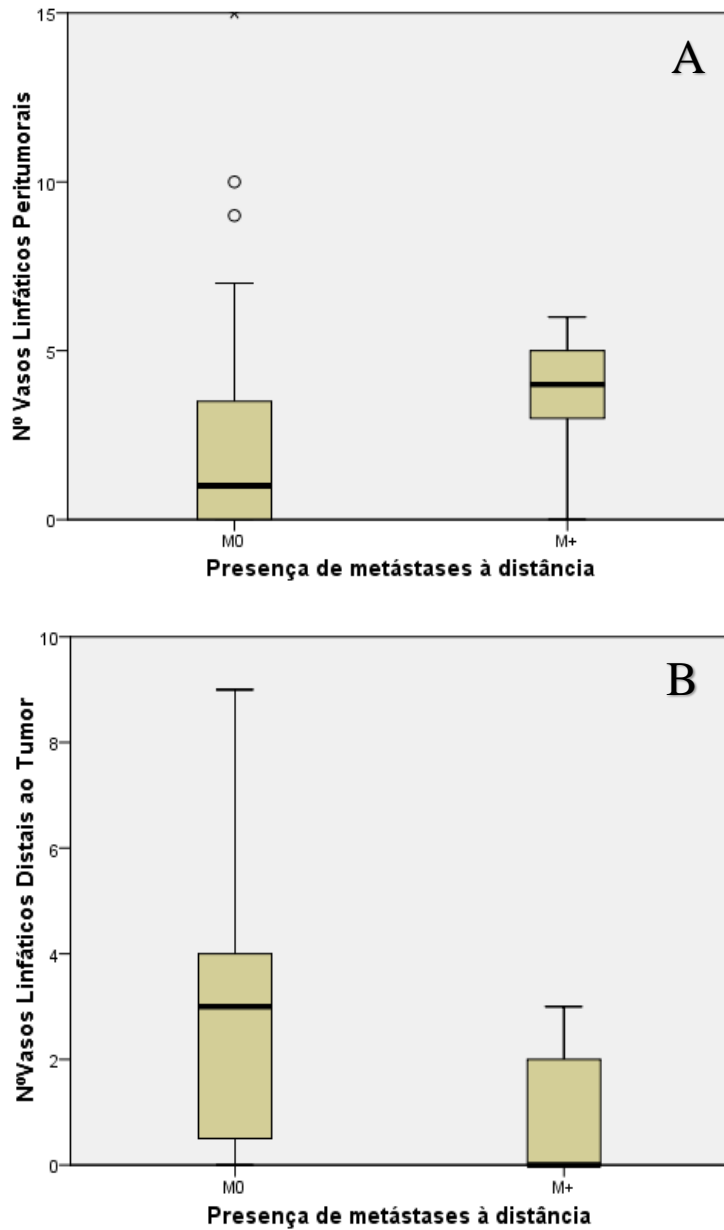
Por fim, no que diz respeito à presença de metástases à distância (pM) e à sua possível influência na densidade linfática, é possível verificar na tabela 4.18 que, a presença de metástases à distância, faz com que a densidade linfática por  $1 \text{ mm}^2$ , seja superior nas regiões peritumorais estudadas. Pelo contrário, ainda nesta tabela, é possível verificar que, nas regiões distais ao tumor a ausência de metástases à distância faz com que densidade linfática por  $1 \text{ mm}^2$ , seja maior. Na tabela 4.19, confirma-se, através do teste de Levene, a homogeneidade das variâncias, uma vez que, a significância associada ao teste, tanto para regiões distais ao tumor como para regiões peritumorais foi superior a 0,05. Assumindo assim a igualdade das variâncias é possível aferir que, pM não tem significância estatística na densidade linfática das regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor dos ADC do cólon estudados. O número vasos linfáticos por  $1 \text{ mm}^2$  segundo a presença ou ausência de metástases à distância está representado nos diagramas de caixa da figura 4.19.



**Figura 4.18** - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por  $1\text{mm}^2$ , nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o número de gânglios isolados e positivos por tumor.

**Tabela 4.18** - Análise estatística da variável estadiamento pM na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

	pM	n	Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	M0	44	2,36	3,286	,495
	M+	5	3,60	2,302	1,030
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	M0	44	2,48	2,029	,306
	M+	5	1,00	1,414	,632



**Figura 4.19** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença ou ausência de metástases à distância (pM).

**Tabela 4.19** - Significância estatística da variável estadiamento pM na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	,633	,430	-,815	47	,419	-1,236	1,517	-4,287	1,815
	Variâncias iguais não assumidas			-1,082	6,036	,321	-1,236	1,143	-4,028	1,555
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	,796	,377	1,578	47	,121	1,477	,936	-,406	3,361
	Variâncias iguais não assumidas			2,103	6,059	,080	1,477	,703	-,238	3,192

#### **4.4.1.5 Influência da variável “invasão perineural” na densidade linfática**

A possível influência da invasão perineural na densidade linfática mesentérica peritumoral e na densidade linfática mesentérica numa região mais distal ao tumor está descrita nas tabelas 4.20 e 4.21. É possível verificar, através da tabela 4.20 que, a densidade linfática, por 1 mm<sup>2</sup>, é maior na presença de invasão perineural em regiões peritumorais e menor nas regiões distais ao tumor. Na tabela 4.21, confirma-se que há homogeneidade das variâncias, uma vez que, a significância associada ao teste de Levene, tanto para regiões distais ao tumor como para as regiões peritumorais foi superior a 0,05. Assumindo assim a igualdade das variâncias é possível verificar que, a invasão perineural não tem significância estatística na densidade linfática mesentérica das regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor dos ADC do cólon estudados.

**Tabela 4.20** - Análise estatística da variável invasão perineural na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

	<b>Invasão perineural</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro padrão da média</b>
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	NÃO	46	2,30	3,203	,472
	SIM	3	5,33	1,528	,882
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	NÃO	46	2,41	2,039	,301
	SIM	3	1,00	1,000	,577

#### **4.4.1.6 Influência da variável “invasão linfovascular” na densidade linfática**

A possível influência da invasão linfovascular na densidade linfática mesentérica das regiões em estudo está descrita nas tabelas 4.22 e 4.23. É possível verificar, através da tabela 4.23 que, a densidade linfática, por 1 mm<sup>2</sup>, é maior na presença de invasão linfovascular em regiões peritumorais e menor nas regiões distais ao tumor. Na tabela 4.22, confirma-se que há homogeneidade das variâncias, uma vez que, a significância associada ao teste de Levene, tanto para regiões distais ao tumor como para as regiões peritumorais foi superior a 0,05. Assumindo assim a igualdade das variâncias é possível aferir que, a invasão linfovascular, à semelhança do que acontece com a invasão perineural, não tem significância estatística na densidade linfática mesentérica.

**Tabela 4.21** - Significância estatística da variável invasão perineural na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	1,065	,307	-1,614	47	,113	-3,029	1,877	-6,805	,747
	Variâncias iguais não assumidas			-3,028	3,300	,050	-3,029	1,000	-6,055	-,003
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	2,360	,131	1,182	47	,243	1,413	1,195	-,992	3,818
	Variâncias iguais não assumidas			2,171	3,222	,112	1,413	,651	-,580	3,406

**Tabela 4.22** - Significância estatística da variável invasão linfovascular na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	,356	,553	-,527	47	,600	-,565	1,072	-2,722	1,591
	Variâncias iguais não assumidas			-,608	24,570	,549	-,565	,930	-2,483	1,352
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	,265	,609	,976	47	,334	,653	,670	-,694	2,000
	Variâncias iguais não assumidas			1,069	22,093	,296	,653	,611	-,613	1,920

**Tabela 4.23** - Análise estatística da variável invasão linfovascular na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

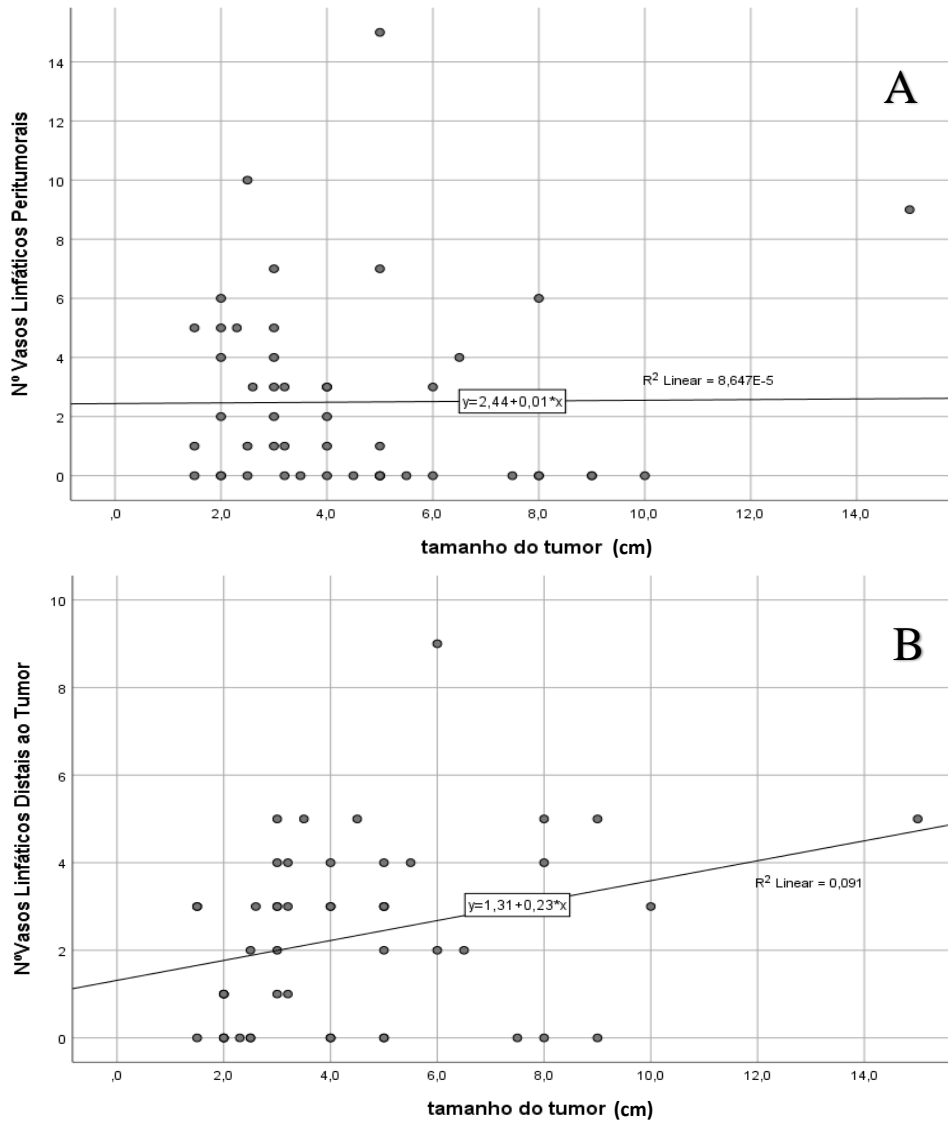
	<b>Invasão Linfovascular</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro padrão da média</b>
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	NÃO	37	2,35	3,401	,559
	SIM	12	2,92	2,575	,743
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	NÃO	37	2,49	2,090	,344
	SIM	12	1,83	1,749	,505

#### 4.4.1.7 Influência da variável “tamanho do tumor” na densidade linfática

A tabela 4.24, obtida através do teste *One-way* ANOVA do SPSS mostra que, a variável tamanho do tumor não exerce poder estatisticamente significativo, num intervalo de confiança de 95%, nem na densidade linfática, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor, dos 49 casos de adenocarcinoma do cólon analisados. Estes dados podem ainda ser verificados, de forma visual, nos gráficos de dispersão da figura 4.20.

**Tabela 4.24** - Significância estatística da variável tamanho do tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>df</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Z</b>	<b>Sig.</b>
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	122,016	18	6,779	,549	,908
	Nos grupos	370,229	30	12,341		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	90,085	18	5,005	1,434	,186
	Nos grupos	104,690	30	3,490		



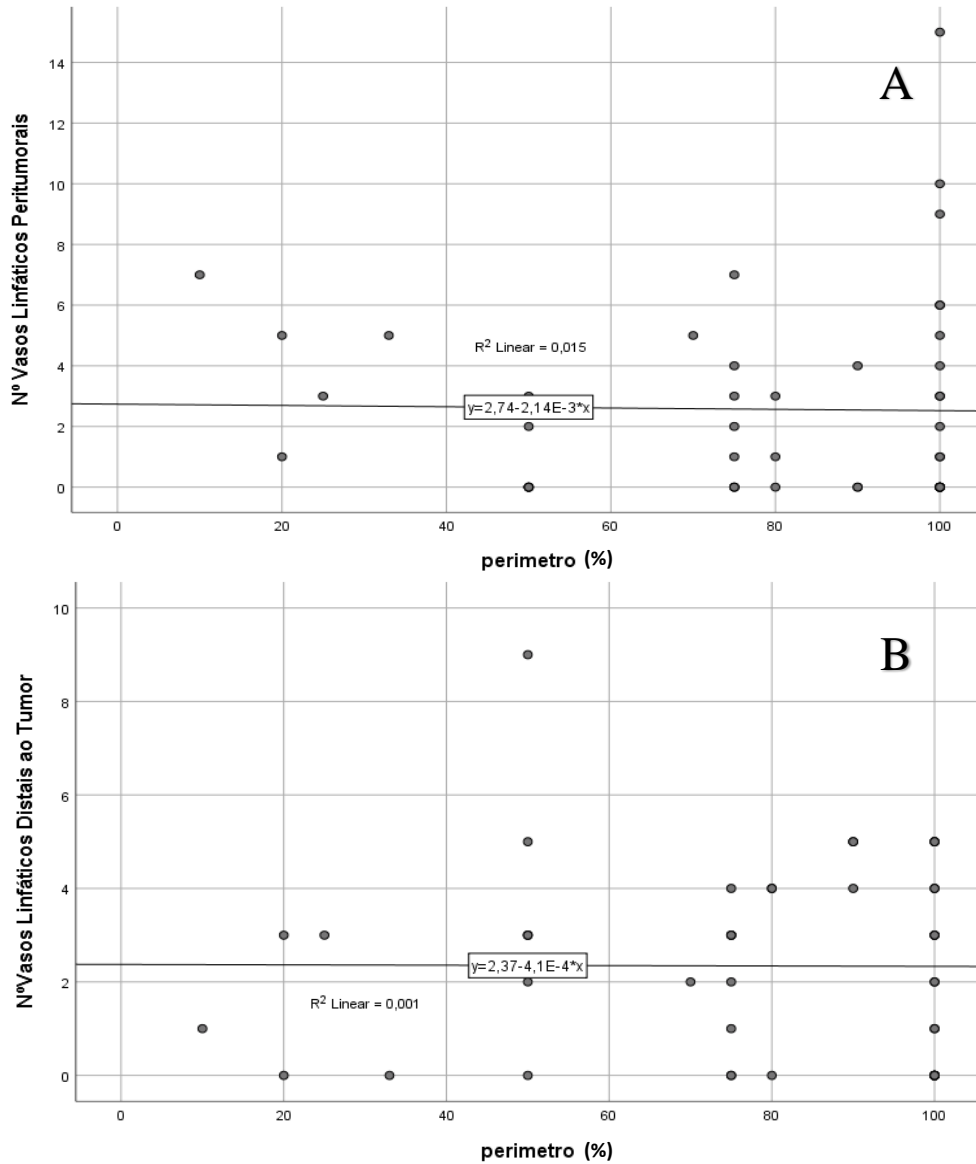
**Figura 4.20** - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o tamanho do tumor.

#### 4.4.1.8 Influência da variável “perímetro ocupado pelo tumor” na densidade linfática

É possível verificar, através da tabela 4.25 que, a variável perímetro do tumor não tem poder estatístico significativo, num intervalo de confiança de 95%, nem na densidade linfática, por 1mm<sup>2</sup>, das regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor, nos 49 casos de adenocarcinoma do cólon analisados. Estes resultados podem ainda ser visualizados nos gráficos de dispersão da figura 4.21.

**Tabela 4.25** - Significância estatística da variável perímetro ocupado pelo tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	84,358	10	8,436	,786	,642
	Nos grupos	407,887	38	10,734		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	41,428	10	4,143	1,027	,440
	Nos grupos	153,348	38	4,035		



**Figura 4.21** - Gráficos de dispersão representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o perímetro ocupado pelo tumor.

#### 4.4.1.9 Influência da variável “padrão mucinoso” na densidade linfática

Podemos verificar, através da tabela 4.26 que, a presença do padrão mucinoso faz com que a densidade linfática, por 1 mm<sup>2</sup>, seja maior nas regiões peritumorais e que, ocorre precisamente o oposto, nas regiões mais distais ao tumor, onde a ausência deste padrão confere um aumento da densidade linfática. No entanto, é possível verificar pela tabela 4.27 que, a variável padrão mucinoso não tem poder estatístico significativo, num intervalo de confiança de 95%, na densidade linfática, das regiões mesentéricas analisadas.

**Tabela 4.26** - Análise estatística da variável padrão mucinoso na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

	Mucinoso	n	Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	NÃO	34	2,38	3,294	,565
	SIM	15	2,73	3,081	,796
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	NÃO	34	2,41	1,828	,313
	SIM	15	2,13	2,446	,631

#### 4.4.1.10 Influência da variável “*budding* tumoral” na densidade linfática

É possível verificar, através da tabela 4.28 que, a presença de *budding* tumoral faz com que a densidade linfática, por 1 mm<sup>2</sup>, seja maior nas regiões distais ao tumor e menor nas regiões peritumorais. Da tabela 4.29 podemos inferir, através do teste de Levene, que a variável *budding* tumoral, uma vez que há homogeneidade das variâncias, não têm significância estatística na densidade linfática mesentérica das regiões peritumorais e distais dos ADC do cólon estudados.

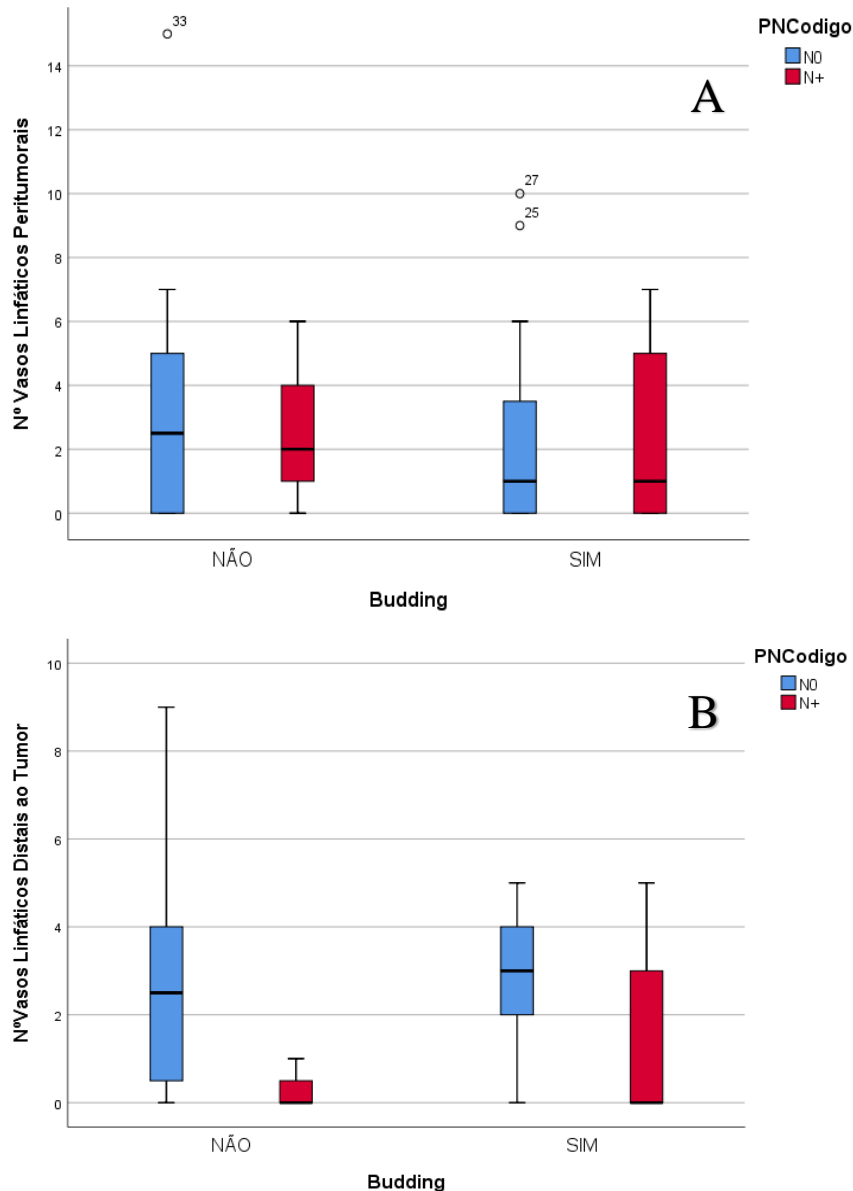
Uma vez que está comprovado, na literatura, que o *budding* tumor está correlacionado com metástases ganglionares linfáticas, (49) foi-se analisar a relação desta variável com o número de gânglios linfáticos isolados e positivos nas regiões mesentéricas peritumorais e distais ao tumor. Verificou-se que, na região peritumoral, a presença de *budding* tumoral bem como a presença de gânglios linfáticos positivos se relaciona com um maior número de vasos linfáticos por 1mm<sup>2</sup>. Pelo contrário, na região mesentérica distal ao tumor, na presença de *budding* tumoral, há um maior número de vasos linfáticos por 1mm<sup>2</sup> quando os gânglios não estão afetados (diagramas de caixa da figura 4.22).

**Tabela 4.27** - Significância estatística da variável padrão mucinoso na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	,026	,873	-,350	47	,728	-,351	1,002	-2,366	1,664
	Variâncias iguais não assumidas			-,360	28,590	,722	-,351	,976	-2,348	1,646
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	,210	,649	,442	47	,660	,278	,630	-,988	1,545
	Variâncias iguais não assumidas			,395	21,203	,697	,278	,705	-1,187	1,744

**Tabela 4.28** - Análise estatística da variável presença de *budding* tumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

	Budding	n	Média	Desvio Padrão	Erro padrão da média
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	NÃO	15	3,27	4,026	1,040
	SIM	34	2,15	2,765	,474
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	NÃO	15	2,27	2,520	,651
	SIM	34	2,35	1,790	,307



**Figura 4.22** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença ou ausência de *budding* tumoral e o número de gânglios linfáticos isolados positivos.

**Tabela 4.29** - Significância estatística da variável presença de *budding* tumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	1,122	,295	1,131	47	,264	1,120	,990	-,871	3,111
	Variâncias iguais não assumidas			,980	20,063	,339	1,120	1,143	-1,263	3,502
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	1,174	,284	-,137	47	,892	-,086	,631	-1,355	1,183
	Variâncias iguais não assumidas			-,120	20,495	,906	-,086	,720	-1,585	1,412

#### 4.4.1.11 Influência da variável “manutenção da integridade do mesocólon” na densidade linfática

A possível influência da variável manutenção da integridade do mesocólon na densidade linfática mesentérica das regiões em estudo encontra-se descrita nas tabelas 4.30 e 4.31. Na tabela 4.30 é evidente que, a densidade linfática por  $1\text{mm}^2$  é maior tanto nas regiões distais ao tumor como nas regiões peritumorais quando a integridade do mesocólon é quebrada. No entanto, é possível verificar pela tabela 4.31 que, a variável integridade do mesocólon, não tem poder estatístico significativo, num intervalo de confiança de 95%, na densidade linfática, das regiões analisadas nos 49 casos de adenocarcinoma do cólon.

**Tabela 4.30** - Análise estatística da variável integridade do mesocólon na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

	<b>Integridade mesocólon</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Erro padrão da média</b>
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	NÃO INTEGRO	15	2,60	4,067	1,050
	INTEGRO	29	2,45	2,898	,538
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	NÃO INTEGRO	15	2,87	1,846	,477
	INTEGRO	29	2,10	2,160	,401

#### 4.4.1.12 Influência da variável “grau de diferenciação tumoral” na densidade linfática

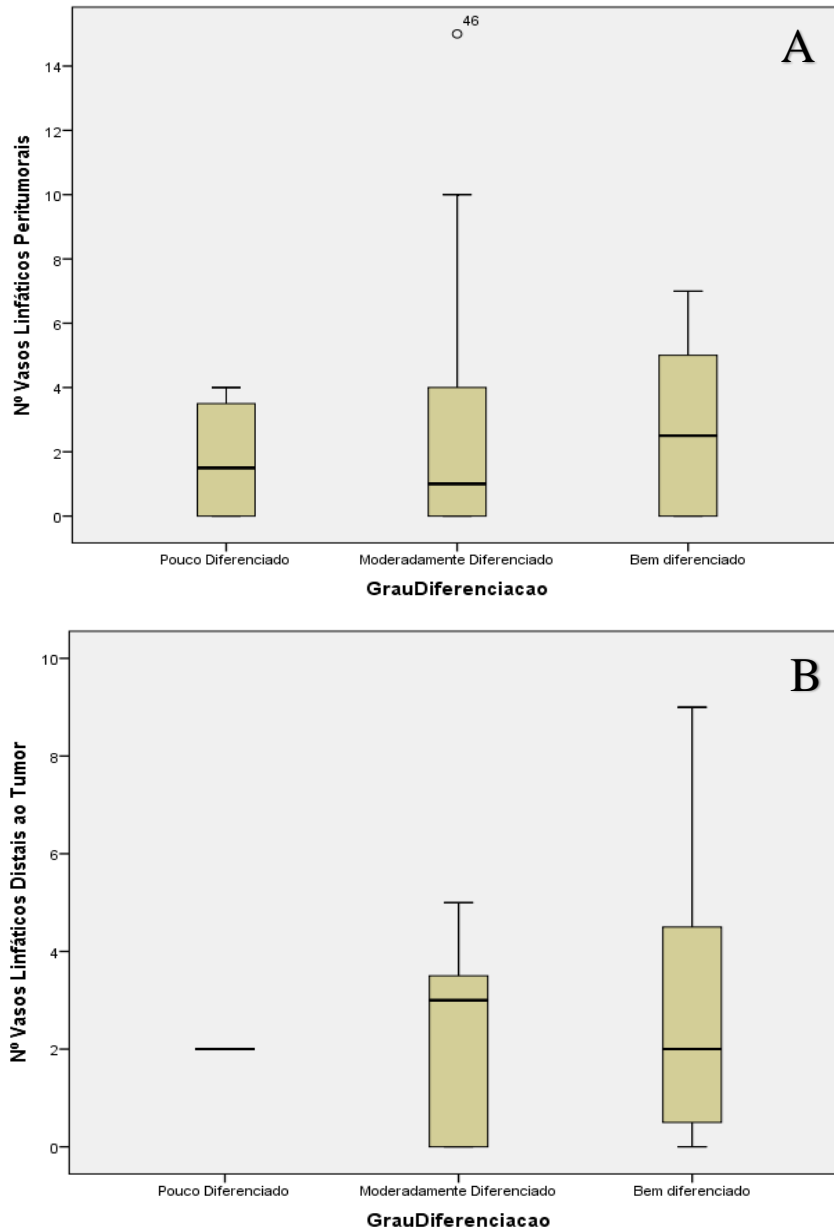
A tabela 4.32, obtida através do teste *One-way* ANOVA do SPSS mostra que, a variável grau de diferenciação do tumor não exerce poder estatisticamente significativo, num intervalo de confiança de 95%, nem na densidade linfática, por  $1\text{mm}^2$ , das regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor, nos 49 casos de ADC do cólon analisados. O número médio de vasos linfáticos distais ao tumor e peritumorais, para cada grau de diferenciação pode ser facilmente verificado na figura 4.23, onde estão representados diferentes diagramas de caixa.

**Tabela 4.31** - Significância estatística da variável integridade do mesocólon na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Teste de Levene para igualdade de variâncias		teste-t para Igualdade de Médias						
		Z	Sig.	t	df	Sig. (2 extremidades)	Diferença média	Erro padrão de diferença	95% Intervalo de Confiança da Diferença	
									Inferior	Superior
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Variâncias iguais assumidas	,434	,514	,143	42	,887	,152	1,060	-1,988	2,291
	Variâncias iguais não assumidas			,129	21,575	,899	,152	1,180	-2,298	2,602
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Variâncias iguais assumidas	,625	,434	1,164	42	,251	,763	,656	-,560	2,086
	Variâncias iguais não assumidas			1,225	32,658	,229	,763	,623	-,505	2,031

**Tabela 4.32** - Significância estatística da variável grau de diferenciação do tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	3,222	2	1,611	,149	,862
	Nos grupos	476,097	44	10,820		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	1,951	2	,976	,233	,794
	Nos grupos	184,602	44	4,196		



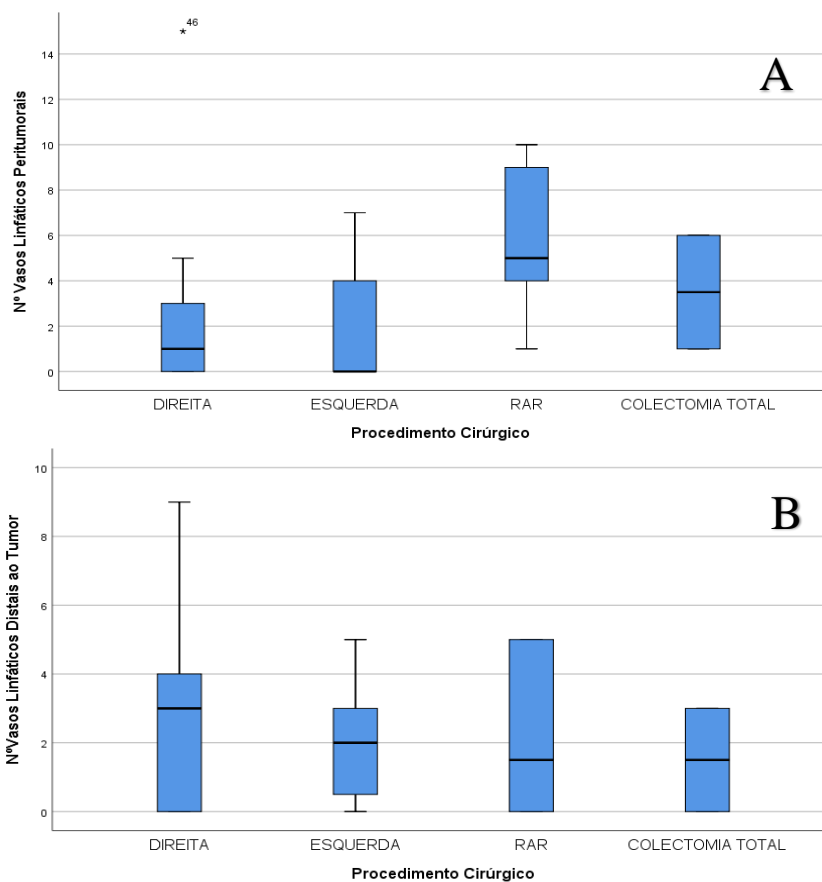
**Figura 4.23** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o grau de diferenciação do tumor.

#### 4.4.1.13 Influência da variável “tipo de intervenção cirúrgica” na densidade linfática

A possível influência do tipo de cirurgia realizada na densidade linfática mesentérica peritumoral e na densidade linfática mesentérica numa região mais distal ao tumor está descrita na tabela 4.33. Verifica-se, inclusive nos diagramas de caixa da figura 4.24 que, independentemente da região mesentérica, o tipo de intervenção cirúrgica não tem influência estatística na densidade linfática dos ADC do cólon estudados.

**Tabela 4.33** - Significância estatística da variável tipo de intervenção cirúrgica realizada na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	74,627	3	24,876	2,680	,058
	Nos grupos	417,618	45	9,280		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	8,170	3	2,723	,657	,583
	Nos grupos	186,605	45	4,147		



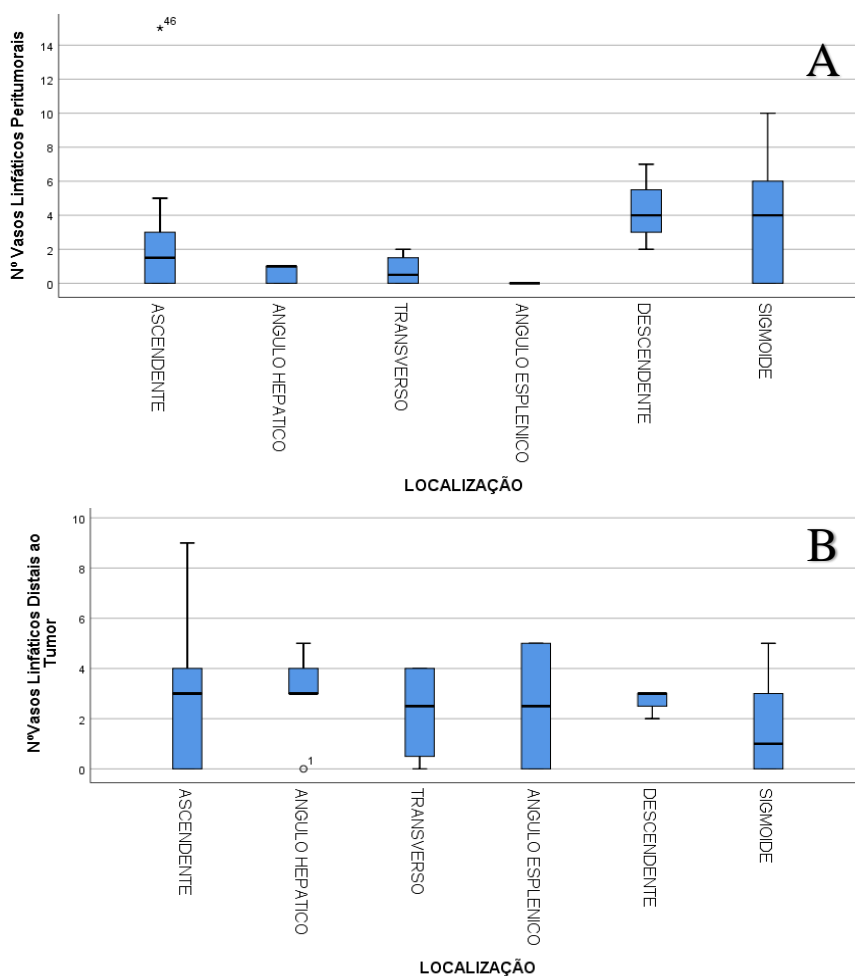
**Figura 4.24** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo o tipo de intervenção cirúrgica realizada.

#### 4.4.1.14 Influência da variável “localização do tumor” na densidade linfática

É possível verificar, através da tabela 4.34 que, a variável localização do tumor não exerce poder estatístico significativo, num intervalo de confiança de 95%, nem na densidade linfática, por 1mm<sup>2</sup>, das regiões peritumorais nem nas regiões mais distais ao tumor, nos 49 casos de adenocarcinoma do cólon analisados. Estes resultados podem ainda ser visualizados nos diagramas de caixa da figura 4.25.

**Tabela 4.34** - Significância estatística da variável localização do tumor na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	71,115	5	14,223	1,452	,225
	Nos grupos	421,130	43	9,794		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	13,365	5	2,673	,634	,675
	Nos grupos	181,410	43	4,219		



**Figura 4.25** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a localização anatômica do tumor.

#### **4.4.1.15 Influência da variável “infiltração linfocítica peritumoral” na densidade linfática**

A possível influência da infiltração linfocítica peritumoral na densidade linfática das regiões em estudo está descrita na tabela 4.35. Verifica-se que, independentemente da região mesentérica (peritumoral ou distal ao tumor) a infiltração linfocítica peritumoral não tem influência estatística, num intervalo de confiança de 95%, na densidade linfática dos ADC do cólon estudados. O número médio de vasos linfáticos distais ao tumor e peritumorais, para cada grau de infiltração linfocítica peritumoral pode ser facilmente visualizado na figura 4.26, onde estão representados diferentes diagramas de caixa.

**Tabela 4.35** - Significância estatística da variável infiltração linfocítica peritumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

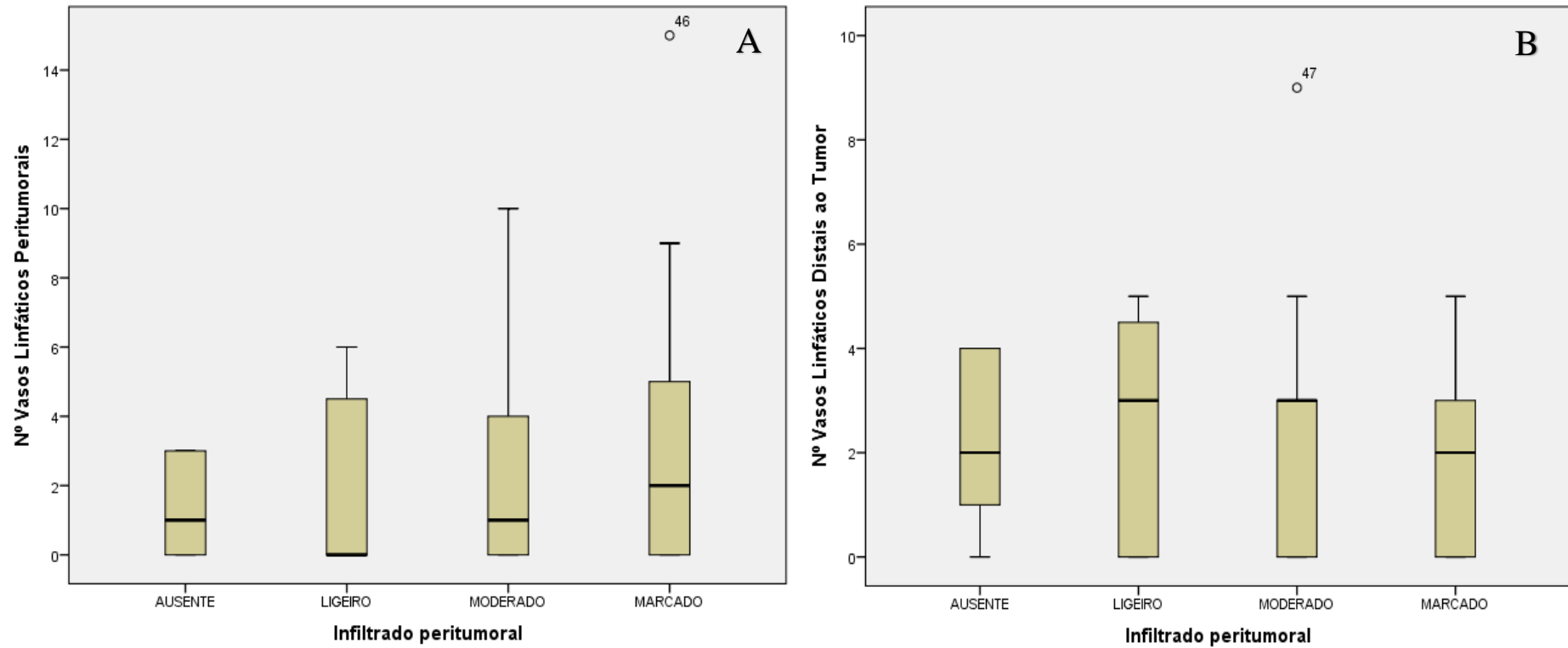
		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	19,389	3	6,463	,610	,612
	Nos grupos	466,527	44	10,603		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	1,727	3	,576	,136	,938
	Nos grupos	185,752	44	4,222		

#### **4.4.1.16 Influência da variável “infiltração linfocítica intratumoral” na densidade linfática**

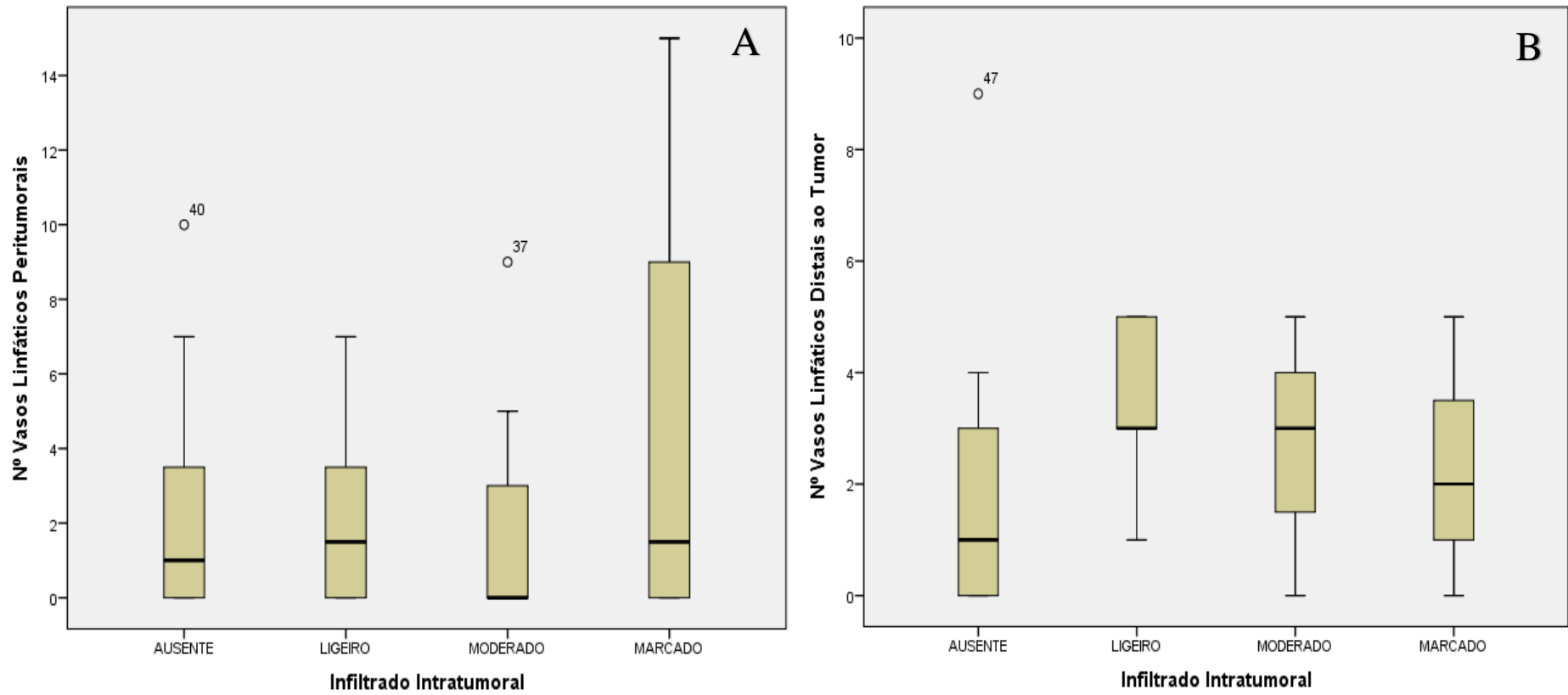
A possível influência da infiltração linfocítica intratumoral na densidade linfática das regiões em estudo está descrita na tabela 4.36. Verifica-se que, tanto para a região mesentérica peritumoral como para a região mesentérica distal ao tumor, a infiltração linfocítica intratumoral não tem influência estatística, num intervalo de confiança de 95%, nos ADC do cólon estudados. O número médio de vasos linfáticos distais ao tumor e peritumorais, para cada grau de infiltração linfocítica intratumoral pode ser facilmente visualizado na figura 4.27, onde estão representados diferentes diagramas de caixa.

**Tabela 4.36** - Significância estatística da variável infiltração linfocítica intratumoral na densidade linfática peritumoral e na densidade linfática distal ao tumor de adenocarcinomas do cólon.

		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
Nº Vasos Linfáticos Peritumorais	Entre Grupos	19,509	3	6,503	,610	,612
	Nos grupos	447,643	42	10,658		
Nº Vasos Linfáticos Distais ao Tumor	Entre Grupos	24,061	3	8,020	2,117	,112
	Nos grupos	159,092	42	3,788		



**Figura 4.26** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença e tipo de infiltração linfocítica peritumoral.



**Figura 4.27** - Diagramas de caixa representando o número de vasos linfáticos identificados, por 1mm<sup>2</sup>, nas regiões peritumorais (A) e nas regiões distais ao tumor (B) segundo a presença e tipo de infiltração linfocítica intratumoral.

## **5 DISCUSSÃO**

O cancro colorretal representa um dos tipos de cancro com maiores taxas de incidência tanto em homens como em mulheres. Para além disso, está associado a altos números de mortalidade (95) daí que seja importante compreender todos os fatores que possam contribuir para o seu desenvolvimento bem como possíveis vias onde seja possível atuar de modo a travar a sua evolução.

Desde que a excisão total do mesorreto passou a ser a abordagem padrão para o tratamento do cancro do reto, demonstrando resultados positivos nas recidivas locais, também alterações nas técnicas cirúrgicas para o tratamento do cancro do cólon passaram a ser um foco de atenção. Surgiu assim, o conceito da excisão mesocólica completa, que consiste na remoção completa do mesentério para o tratamento do cancro do cólon (64). Embora, nos últimos tempos, esta técnica cirúrgica tenha recebido importância crescente e tenha sido estabelecido o seu inequívoco benefício em estudos clínicos, a sua utilização como intervenção padrão e a sua implementação rotineira é atualmente discutida.

De facto, sabemos que a excisão completa do mesocólon, portanto a remoção completa do envelope mesentérico que rodeia o tumor do cólon, condiciona melhores resultados do ponto de vista clínico, conferindo maiores taxas de sobrevida e recidivas locais ou à distância inferiores. Não se encontram atualmente compreendidas as razões biológicas nos quais se baseiam estes resultados favoráveis e até ao momento ainda não se conseguiu entender o verdadeiro benefício da manutenção da integridade da rede linfática.

Sabe-se, no entanto, que a densidade linfática já foi descrita em vários tipos de tumor, tendo sido relacionada com o prognóstico da doença e com metástases precoces (96). Assim, neste trabalho, utilizou-se uma abordagem imunohistoquímica com o intuito de determinar a densidade linfática mesentérica em regiões peritumorais e em regiões distais ao tumor. A imunohistoquímica foi realizada com recurso ao anticorpo podoplanina D2-40, que já tem sido utilizado com sucesso em vários estudos para identificar vasos linfáticos (97).

Os resultados deste estudo permitiram verificar que a densidade linfática peritumoral é ligeiramente maior do que a densidade linfática em regiões mais distais ao tumor

( $2.49 \pm 3.20$  vs  $2.33 \pm 2.01$ , respetivamente). No entanto, a diferença é pequena e os resultados inferiores ao esperado, tendo em conta o que tinha sido anteriormente descrito por Culligan et al. (76). Ora, sendo certo que, a linfangiogénese existe e que se apresenta como uma das vias para a disseminação metastática do CCR (metastização linfática) seria de esperar, tal como defendem estudos anteriores, (98) uma densidade linfática peritumoral consideravelmente maior à densidade linfática presente em regiões longínquas ao tumor. Assim, olhando para os resultados deste trabalho pode-se, de modo hipotético considerar, por um lado, que o papel da linfangiogénese pode não ser tão relevante quanto o esperado e que, em casos de CCR, os tumores recorrem mais à angiogénese do que à linfangiogénese para o seu crescimento e metastização. Ou, por outro lado, talvez os resultados deste estudo criem pressupostos para o facto da existência de um estímulo, criado pelos tumores, para o desenvolvimento de linfangiogénese, mas esse estímulo é igual tanto nas regiões de proximidade ao tumor como nas regiões distais ao tumor. De facto, estudo anteriores desenvolvidos por Enquist et al. apoiam a primeira hipótese uma vez que defendem, através de modelos experimentais de murganhos, que existe metastização sem o interposto intermediário dos gânglios linfáticos, isto é, que os tumores no CCR podem recorrer à disseminação hematogénica (direta do tumor primário sem passar pelos linfáticos) (99).

Este estudo centrou-se ainda na compreensão da influência de alguns parâmetros clinico-patológicos e clinico-histológicos na densidade linfática mesentérica. Quanto aos parâmetros clinico-patológicos analisados, nomeadamente a idade e o género, critérios que Culligan et al. não tinham conseguido avaliar nos seus estudos devido ao coorte reduzido (76) verificou-se que, a idade não é uma variável correlacionável com a densidade linfática peritumoral ( $p=0,769$ ) nem com a densidade linfática em regiões distais ao tumor ( $p=0,683$ ). Estudos anteriores levados a cabo por Duff et al. (100) e Pappas et al. (96) também não conseguiram estabelecer uma relação entre a idade de diagnóstico de adenocarcinomas do cólon e a densidade linfática. Quanto ao género, verifica-se uma situação semelhante, não sendo também possível, a partir dos resultados deste estudo, estabelecer uma correlação significativa entre o género masculino/feminino e a densidade linfática peritumoral ( $p=0,742$ ) ou a densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,943$ ). Também Pappas et al. tinha demonstrado nos seus estudos, um *P-value* bastante superior a 0,05 no que dizia respeito à influência da variável género na densidade linfática, (96) corroborando assim com os resultados obtidos. Um outro parâmetro

clínico-patológico que se avaliou, foi a possível influência do índice de massa corporal (IMC), na densidade linfática peritumoral e distal ao tumor. Não foi possível correlacionar o IMC com a densidade linfática peritumoral ( $p=0,823$ ) embora, se tenha verificado que o IMC poderá ser um fator a ter em conta na densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,012$ ). O aumento de vasos linfáticos distais ao tumor por  $1\text{mm}^2$  e a consequente diferença significativa encontrada foi prevista e pode ser justificada pelo facto de indivíduos com um IMC elevado possuírem anatomicamente um mesocólon (constituído por tecido conjuntivo, mas também por tecido adiposo, sendo que, em pessoas com excesso de peso, há uma quantidade maior de gordura) mais espesso na região distal ao tumor. Quanto à variável clínico-patológica localização do tumor, também não foi possível estabelecer, através dos resultados deste estudo, uma correlação com a densidade linfática peritumoral ( $p=0,225$ ) ou com a densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,675$ ), este resultado foi semelhante ao já descrito no estudo anteriormente realizado por Pappas et al. (96) O tipo de intervenção cirúrgica realizada, um outro critério analisado, também não demonstrou qualquer significância na densidade linfática peritumoral ( $p=0,058$ ) nem na densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,583$ ).

Os parâmetros clínico-histológicos estudados foram: o tamanho do tumor e o perímetro por ele ocupado, o número de gânglios linfáticos isolados e dentro destes o número de gânglios positivos, o estadió pTNM, as invasões e infiltrações, o grau de diferenciação, a presença de padrão mucinoso, de *budding* tumoral e a integridade do mesocólon. Foram analisadas as características tamanho do tumor bem como o perímetro ocupado por ele, pois embora sejam características que não têm significado prognóstico, podem ser importantes para o controlo de qualidade (101). O tamanho do tumor e o perímetro por ele ocupado não demonstraram ser parâmetros significativos nem para a densidade linfática peritumoral nem para a densidade linfática distal ao tumor. As invasões perineural e linfovascular foram outros parâmetros que se consideraram importantes analisar uma vez que, a invasão perineural é um percurso claro para a disseminação de células cancerígenas (102) e a invasão linfovascular, acredita-se que esteja envolvida no progresso das metástases linfáticas (103). Para além disso, relativamente às infiltrações, estudos recentes indicam que a infiltração linfocítica intratumoral pode ser um fator de prognóstico para o estudo do CCR sendo associada a instabilidade microssatélite (104) e a infiltração linfocítica peritumoral é vista como um fator positivamente associado à melhoria da sobrevida na doença de CCR (105).

Relativamente às invasões perineural e linfovascular, os resultados deste estudo demonstraram para ambas que não havia uma correlação significativa na densidade linfática peritumoral ou na densidade linfática distal ao tumor. No entanto, na literatura existem descritas correlações significativas entre a invasão linfovascular e a densidade de microvasos linfáticos em cancro da mama (106) e em cancro colorretal (107). Para além disso, a invasão perineural, também se encontra descrita por Zhou et al. como intimamente correlacionada com a invasão a vasos (108). Neste trabalho, as infiltrações linfocíticas intratumoral e linfovascular, também não aparentam ter significância na densidade linfática mesentérica peritumoral ou distal ao tumor. Não obstante, através dos diagramas de caixa da figura 4.27A é possível verificar uma aparente tendência valorizável relativamente à infiltração linfocítica intratumoral marcada e o respetivo aumento do número de vasos linfáticos por  $1\text{mm}^2$  na região peritumoral o que, de certo modo, poderia concordar com os estudos realizados recentemente e que indicam uma relação positiva entre a infiltração inflamatória e a invasão a vasos linfáticos (109). Quanto à presença ou ausência do padrão mucinoso, verificou-se que a grande maioria dos casos em estudo (69,4%) não apresentava este padrão. Nos ADC do cólon a presença deste padrão está associada a um mau prognóstico e a maiores índices de recidivas (110). No entanto, relativamente à influência deste padrão na densidade linfática mesentérica, constatou-se, através dos resultados obtidos, que a sua presença também não parece ser um fator significativo nem na densidade linfática peritumoral ( $p=0,722$ ) nem na densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,660$ ). Sabe-se, todavia, segundo a literatura, que a presença do padrão mucinoso em CCR está associado a maiores probabilidades de recidiva locoregional (111). O *budding* tumoral foi um outro parâmetro clínico-histológico analisado ao longo deste estudo. Verificou-se que o *budding* tumoral ocorreu na grande maioria da amostra de estudo (34/49) sendo o *budding* classificado como fator de prognóstico adicional e considerado uma característica histomorfológica que representa a agressividade do tumor (51,112). Todavia, na densidade linfática, parece não exercer grande efeito uma vez que, os resultados deste estudo não demonstraram correlações significativas entre o *budding* tumoral e a densidade linfática peritumoral ( $p=0,264$ ) ou a densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,892$ ). Estudos anteriores levados a cabo por Cacchi et al. também não conseguiram encontrar associações entre o *budding* tumoral e a densidade linfática de casos de carcinomas colorretais de estadió pT3, reforçando assim os resultados obtidos neste estudo relativamente à influência deste parâmetro clínico-histológico (113). A maioria dos doentes presentes neste estudo

possuía um grau histológico moderadamente diferenciado do tumor (63,3%), sendo que o grau de diferenciação de tumor permite ter uma ideia da organização e aparência das células e do grau de invasão dos tecidos (5). Todavia, na densidade linfática o grau de diferenciação tumoral parece não desempenhar um papel significativo, uma vez que não demonstrou correlações nem com a densidade linfática peritumoral ( $p=0,862$ ) nem com a densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,794$ ), estes resultados foram semelhantes aos publicados na literatura e onde se defende que a densidade linfática não está associada ao grau de diferenciação tumoral (96). Relativamente à integridade do mesocólon, e ao contrário do que era espectável, verificou-se que a manutenção ou não da sua integridade parece não influenciar a densidade linfática mesentérica peritumoral e/ou distal ao tumor. Estes resultados levam a repensar a importância que tem sido dada à manutenção de um mesocólon íntegro para a não ruptura da rede linfática, nomeadamente na técnica cirúrgica da CME defendida por Hohenberger et al. (59). Dos 49 casos de adenocarcinoma do cólon em estudo apenas existiam estadios T2 e T3 com clara predominância do estadio T3 (75,5%). A maioria dos casos não apresentava envolvimento dos gânglios linfáticos (73,5%) nem metástases à distância (89,9%). Relativamente ao estadiamento pTNM verificou-se que a profundidade de invasão na parede (pT) bem como o envolvimento de gânglios linfáticos (pN) não demonstrava significância na densidade linfática peritumoral mas demonstrava correlação na densidade linfática distal ao tumor com  $p=0,011$  para pT e  $p=0,004$  para pN. Estudos anteriores, levados a cabo por Matsumoto et al. demonstraram uma associação significativa entre a densidade linfática e a profundidade de invasão (pT) mas não encontraram significância com o envolvimento ganglionar (pN) (114). Em relação à presença de metástases à distância (pM) verificou-se que não existia correlação nem com a densidade linfática peritumoral ( $p=0,419$ ) nem com a densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,121$ ) o que foi contra os resultados publicados na literatura e defendidos por Filho et al. que obtiveram correlação entre densidade linfática peritumoral e a presença de metástases no fígado (115). Foi ainda analisado o número de gânglios linfáticos isolados uma vez que, existem estudos que demonstram que uma diminuição nas recidivas da doença de CCR, pode estar relacionada com o número de gânglios isolados (116). No entanto, relativamente à densidade linfática, os resultados deste estudo, não indicaram uma correlação significativa entre o número de gânglios linfáticos isolados e a densidade linfática peritumoral ou distal ao tumor. Por outro lado, a quantidade de gânglios linfáticos isolados e positivos também não aparenta ter correlação com a densidade

linfática peritumoral ( $p=0,273$ ) o que está de acordo com estudos realizados anteriormente (115) mas, em contrapartida, aparenta ter significância na densidade linfática distal ao tumor ( $p=0,021$ ). A significância verificada entre a densidade linfática distal ao tumor e o número de gânglios linfáticos positivos corresponde àquilo que era espectável uma vez que, no gráfico de dispersão da figura 4.18 B se verifica que o número de vasos linfáticos por  $1\text{mm}^2$  aumenta à medida que o número de gânglios positivos também aumenta, o que vai de encontro ao que se encontra publicado na literatura por Lu et al. que garantem que a expressão de podoplanina é maior em pacientes com metástases nos gânglios linfáticos (gânglios positivos) (117).

Reflete-se assim, que a formação de uma grande e complexa rede linfática, embora aparentemente importante, permanece ainda por decifrar uma vez que, continua a apresentar-se apenas como uma das etapas de um processo multifatorial que é a formação de metástases e disseminação dos carcinomas. Para a propagação da falta de entendimento do real papel da linfangiogénese no tumor, nomeadamente no CCR, continuam a contribuir os resultados contraditórios sobre o papel da densidade linfática na progressão do cancro. Estas diferenças apresentadas ao longo dos tempos nos diversos estudos desenvolvidos podem dever-se a dissemelhanças utilizadas na metodologia, tais como a seleção dos anticorpos, a padronização dos protocolos de contagem dos vasos linfáticos resultantes da imunohistoquímica e ainda a eleição da área de contagem desses mesmos linfáticos. Embora, atualmente, não exista um marcador linfático perfeito, o anticorpo monoclonal D2-40 utilizado neste estudo tem sido apresentado como um dos marcadores mais confiáveis, com alta especificidade e sensibilidade para os vasos linfáticos (83) no entanto, após a realização deste trabalho, o papel clínico da vasculatura linfática na progressão do tumor permanece inexplicado uma vez que, os resultados obtidos continuam a ser contestados com os diferentes dados publicados na literatura.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho conseguiu definir a densidade linfática peritumoral e distal ao tumor no órgão mesentérico de doentes com adenocarcinoma do cólon de estadios T2 e T3. Apesar da densidade ser ligeiramente inferior ao esperado, quando comparado com os estudos de Culligan et al., (76) ressalva-se que este estudo foi realizado em 49 indivíduos doentes e em tecido não cadavérico ao invés do estudo de Culligan et al. que foi realizado apenas em 12 indivíduos saudáveis e em tecido proveniente de cadáver daí que, as diferenças metodológicas, possam justificar as discrepâncias encontradas.

Este estudo comparou ainda a influência de diversas características clínico-patológicas e clínico-histológicas na densidade linfática mesentérica e verificou que apenas na região distal ao tumor havia diferenças significativas. Apenas o índice de massa corporal, a profundidade de invasão do tumor (pT), o envolvimento de gânglios linfáticos (pN) e o número de gânglios isolados positivos poderiam fazer variar a densidade linfática mesentérica nas regiões distais ao tumor. O facto de só a região distal ao tumor variar na presença de algumas características clínico-patológicas ou clínico-histológicas representa uma descoberta potencialmente relevante para a área da cirurgia uma vez que realça a importância de uma técnica cirúrgica bem executada.

Este estudo destaca-se pelo facto de realizar uma análise da densidade linfática numa região distal ao tumor (no local de laqueação) o que não é comum encontrar-se na literatura uma vez que, comumente, os grupos de investigação fazem apenas uma avaliação intratumoral e peritumoral.

Com este estudo, o real papel da linfangiogénese na progressão tumoral do CCR continua por compreender uma vez que os resultados estão muitas vezes em contrassenso com o que se encontra publicado na literatura. De facto, nas últimas décadas o papel da linfangiogénese na disseminação e metastização do cancro tem sido amplamente estudado, no entanto, provavelmente a angiogénese, um dos *hallmarks of cancer*, é mais proeminente na biologia e propagação do tumor, pelo menos em casos de ADC do cólon. Como tal, sugere-se que mais estudos nesta área sejam realizados, nomeadamente, estudos em que se consigam distinguir vasos linfáticos pré-existentes de vasos linfáticos recém-formados e estudos que avaliem o comprimento do mesocólon.

*“Recomeça... Se puderes Sem angústia E sem pressa. E os passos que deres, Nesse caminho duro Do futuro Dá-os em liberdade. Enquanto não alcances Não descanses. De nenhum fruto queiras só metade”*

*Miguel Torga*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weinberg RA. The biology of cancer. Second Edi. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2014. 31-69; 439-455 p.
2. Weinberg RA. How Cancer Arises. *Sci Am* [Internet]. 1996 Sep;275(3):62–70. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/scientificamerican0996-62>
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar;144(5):646–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>
4. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*. 2017.
5. NIH - National Cancer Institute [Internet]. [cited 2018 Jun 30]. Available from: <https://www.cancer.gov/>
6. David AR, Zimmerman MR. Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010 Oct 3;10(10):728–33. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc2914>
7. Dunn B. Cancer: Solving an age-old problem. *Nature* [Internet]. 2012 Mar 1;483(7387):S2–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/483S2a>
8. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2011 Jul;61(4):212–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20121>
9. Luddy KA, Robertson-Tessi M, Tafreshi N, Soliman H, Morse DL. The role of toll-like receptors in colorectal cancer progression: Evidence for epithelial to leucocytic transition (ELT). *Front Immunol*. 2014;
10. Borghesi L, Milcarek C. Innate versus Adaptive Immunity: A Paradigm Past Its Prime? *Cancer Res* [Internet]. 2007 Apr 24;67(9):3989–93. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-0182>
11. Markman JL, Shiao SL. Impact of the immune system and immunotherapy in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2015;
12. Garziera M, Toffoli G. Inhibition of host immune response in colorectal cancer: Human leukocyte antigen-G and beyond. *World J Gastroenterol*. 2014;
13. Wittig B, Schmidt M, Scheithauer W, Schmoll HJ. MGN1703, an immunomodulator and toll-like receptor 9 (TLR-9) agonist: From bench to bedside. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2015.
14. Pernot S, Terme M, Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Tartour E, et al. Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;
15. Henry CJ, Sedjo RL, Rozhok A, Salstrom J, Ahnen D, Levin TR, et al. Lack of significant association between serum inflammatory cytokine profiles and the presence of colorectal adenoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Dec 14;15(1):123. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-015-1115-2>
16. Kasper, Dennis L., Braunwald, Eugene, Hauser, Stephen, Longo, Dan, Jameson, J. Larry, and Fauci AS. Harrison’s Principles of Internal Medicine. In: 16th ed. McGraw-Hill Professional; 2004. p. 527–31.
17. Grizzi F. Prognostic value of innate and adaptive immunity in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2013;19(2):174. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i2/174.htm>

18. Ogino S, Galon J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer immunology—analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2011 Dec 9;8(12):711–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrclinonc.2011.122>
19. McHugh SM, O’Donnell J, Gillen P. Genomic and oncoproteomic advances in detection and treatment of colorectal cancer. *World J Surg Oncol* [Internet]. 2009;7(1):36. Available from: <http://wjso.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7819-7-36>
20. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Internet]. [cited 2018 Jun 4]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)
21. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas 2017 [Internet]. [cited 2018 May 23]. Available from: <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-anos-dos-dados.aspx>
22. Tommelein J, Verset L, Boterberg T, Demetter P, Bracke M, De Wever O. Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2015 Mar 23;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00063/abstract>
23. American Cancer Society - Colorectal Cancer Risk Factors [Internet]. [cited 2017 Jul 13]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
24. American Cancer Society - Colorectal Cancer Facts & Figures 2017-2019 [Internet]. [cited 2018 Jul 5]. Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/colorectal-cancer-facts-figures.html>
25. Instituto CUF de Oncologia - Fatores de Risco [Internet]. [cited 2017 Jul 13]. Available from: <https://www.saudecuf.pt/oncologia/o-cancro/cancro-do-colon-e-reto/fatores-de-risco>
26. Sobotta J. SOBOTTA Atlas of Human Anatomy - Internal Organs. 15th editi. Elsevier; 2011. 92-102 p.
27. HealthJade: Large intestine [Internet]. [cited 2018 Jul 4]. Available from: <https://healthjade.com/large-intestine/>
28. Collin P. Dictionary of Medical Terms. Fourth. A & C Black Publishers Ltd; 2005. 242 p.
29. Coffey JC. Surgical anatomy and anatomic surgery – Clinical and scientific mutualism. *Surg* [Internet]. 2013 Aug;11(4):177–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1479666X13000371>
30. Treves F. Lectures on the Anatomy of the Intestinal Canal and Peritoneum in Man. *BMJ* [Internet]. 1885 Mar 21;1(1264):580–3. Available from: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.1.1264.580>
31. Coffey JC, Sehgal R, Culligan K, Dunne C, McGrath D, Lawes N, et al. Terminology and nomenclature in colonic surgery: universal application of a rule-based approach derived from updates on mesenteric anatomy. *Tech Coloproctol* [Internet]. 2014 Sep 27;18(9):789–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10151-014-1184-2>
32. Sehgal R, Coffey JC. Historical development of mesenteric anatomy provides a universally applicable anatomic paradigm for complete/total mesocolic excision. *Gastroenterol Rep* [Internet]. 2014 Nov 1;2(4):245–50. Available from: <https://academic.oup.com/gastro/article-lookup/doi/10.1093/gastro/gou046>
33. Culligan K, Walsh S, Dunne C, Walsh M, Ryan S, Quondamatteo F, et al. The

- Mesocolon. *Ann Surg* [Internet]. 2014 Dec;260(6):1048–56. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00000658-201412000-00019>
34. Culligan K, Coffey JC, Kiran RP, Kalady M, Lavery IC, Remzi FH. The mesocolon: A prospective observational study. *Color Dis*. 2012;
  35. Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep*. 2014;
  36. Maughan NJ, Quirke P. Modern management of colorectal cancer--a pathologist's view. *Scand J Surg* [Internet]. 2003;92(1):11–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12705546>
  37. Kerr J, Broadstock M, Day P, Hogan S. Effectiveness and cost-effectiveness of population screening for colorectal cancer. *NZHTA Rep*. 2007;8.
  38. American Joint Committee on Cancer - Cancer Staging Manual [Internet]. [cited 2018 Jul 5]. Available from: <http://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/default.aspx>
  39. Compton CC. Key issues in reporting common cancer specimens: Problems in pathologic staging of colon cancer. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2006.
  40. Liga Portuguesa Contra o Cancro - Estadiamento [Internet]. [cited 2018 Jul 5]. Available from: <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-do-colon-e-do-recto-estadiamento/>
  41. Kerr D, Young A, Hobbs R. *ABC OF COLORECTAL CANCER*. BMJ Books; 2001. 8 p.
  42. Schwartz RN, Blanke CD, Pesko LJ. Targeted therapies in the treatment of colorectal cancer: what managed care needs to know. *J Manag Care Pharm* [Internet]. 2004 Oct;10(5 Suppl B):S2-13; quiz S14-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546221>
  43. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour “budding” as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;
  44. Bektas SS, Mamak GI, Ciris IM, Bozkurt KK, Kapucuoglu N. Tumor budding in colorectal carcinomas. *Turkish J Pathol*. 2012;
  45. Prall F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2007.
  46. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: A promising parameter in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*. 2012.
  47. Grizzi F, Celesti G, Basso G, Laghi L. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hype or hope? *World J Gastroenterol*. 2012;
  48. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: Tumor budding as oncotarget. *Oncotarget*. 2010;
  49. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor budding in colorectal carcinoma: Time to take notice. *Mod Pathol*. 2012;
  50. Kalluri R. EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *Journal of Clinical Investigation*. 2009.
  51. Graham RP, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Laird PW, Weisenberger DJ, et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: Confirmation of prognostic significance and histologic cutoff in a population-based cohort. *Am J Surg Pathol*. 2015;
  52. Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2005;
  53. Zlobec I, Borner M, Lugli A, Inderbitzin D. Role of intra- and peritumoral budding in the interdisciplinary management of rectal cancer patients. *International Journal*

- of Surgical Oncology. 2012.
54. van Wyk HC, Park J, Roxburgh C, Horgan P, Foulis A, McMillan DC. The role of tumour budding in predicting survival in patients with primary operable colorectal cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2015 Feb;41(2):151–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737214002126>
  55. Jass JR, O’Brien J, Riddell RH, Snover DC. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008.
  56. Compton CC. Colorectal carcinoma: diagnostic, prognostic, and molecular features. *Mod Pathol*. 2003;
  57. De Mattia E, Cecchin E, Toffoli G. Pharmacogenomics of intrinsic and acquired pharmacoresistance in colorectal cancer: Toward targeted personalized therapy. *Drug Resist Updat*. 2015;
  58. Colorectal Cancer: A Guide for Patients [Internet]. 2016 [cited 2018 Jul 9]. Available from: <https://www.esmo.org/Patients/Patient-Guides/Colorectal-Cancer>
  59. Hohenberger W, Weber K, Matzel K, Papadopoulos T, Merkel S. Standardized surgery for colonic cancer: Complete mesocolic excision and central ligation - Technical notes and outcome. *Color Dis*. 2009;
  60. Heald RJ, Husband EM, Ryall RDH. The mesorectum in rectal cancer surgery??the clue to pelvic recurrence? *Br J Surg*. 1982;
  61. Fischer J, Joern F, Hellmich G, Gunter H, Jackisch T, Thomas J, et al. Outcome for stage II and III rectal and colon cancer equally good after treatment improvement over three decades. *Int J Colorectal Dis*. 2015;
  62. Carneiro C, Rocha R, Marinho R, Gomes A, Leichsenring C, Geraldés V, et al. Excisão completa do mesocólon – revisão da literatura. *Rev Port Cir*. 2016;38:19–29.
  63. Bertelsen CA, Neuenschwander AU, Jansen JE, Wilhelmsen M, Kirkegaard-Klitbo A, Tenma JR, et al. Disease-free survival after complete mesocolic excision compared with conventional colon cancer surgery: A retrospective, population-based study. *Lancet Oncol*. 2015;
  64. Willaert W, Ceelen W. Extent of surgery in cancer of the colon: Is more better? *World J Gastroenterol*. 2015;
  65. Storli KE, Søndena K, Furnes B, Nesvik I, Gudlaugsson E, Bukholm I, et al. Short term results of complete (D3) vs. standard (D2) mesenteric excision in colon cancer shows improved outcome of complete mesenteric excision in patients with TNM stages I-II. *Tech Coloproctol*. 2014;
  66. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*. 2006.
  67. Farnsworth RH, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic endothelium: An important interactive surface for malignant cells. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*. 2006.
  68. Padera TP, Kadambi A, Di Tomaso E, Mouta Carreira C, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* (80- ). 2002;
  69. Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO. Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res*. 2005;
  70. Detmar M, Hirakawa S. The Formation of Lymphatic Vessels and Its Importance in the Setting of Malignancy. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Sep 16;196(6):713–8.

- Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20021346>
71. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol.* 2006;
  72. Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell.* 2002.
  73. Cao Y. Emerging mechanisms of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nature Reviews Cancer.* 2005.
  74. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova T V., et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004;
  75. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: Development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in Immunology.* 2004.
  76. Culligan K, Sehgal R, Mulligan D, Dunne C, Walsh S, Quondamatteo F, et al. A detailed appraisal of mesocolic lymphangiology - an immunohistochemical and stereological analysis. *J Anat [Internet].* 2014 Oct;225(4):463–72. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/joa.12219>
  77. Jamieson JK, Dobson JF. VII. Lymphatics of the Colon: With Special Reference to the Operative Treatment of Cancer of the Colon. *Ann Surg [Internet].* 1909 Dec;50(6):1077–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17862448>
  78. Akishima Y, Ito K, Zhang L, Ishikawa Y, Orikasa H, Kiguchi H, et al. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows Arch [Internet].* 2004 Feb 1;444(2):153–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-003-0950-8>
  79. Jackson DG. Lymphatic markers, tumour lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Cancer Treat Res [Internet].* 2007;135:39–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17953407>
  80. Lai J-H, Zhou Y-J, Bin D, Qiangchen Q, Wang S-Y. Clinical Significance of Detecting Lymphatic and Blood Vessel Invasion in Stage II Colon Cancer Using Markers D2-40 and CD34 in Combination. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;
  81. Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, et al. Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem.* 2003;
  82. Kono T, Shimoda M, Takahashi M, Matsumoto K, Yoshimoto T, Mizutani M, et al. Immunohistochemical detection of the lymphatic marker podoplanin in diverse types of human cancer cells using a novel antibody. *Int J Oncol.* 2007;
  83. Van Der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *British Journal of Cancer.* 2006.
  84. FCIências - Técnicas de Coloração Laboratório Online [Internet]. 2014 [cited 2018 Aug 8]. Available from: <https://www.fciencias.com/2014/06/26/tecnicas-de-coloracao/>
  85. Feldman AT, Wolfe D. Tissue Processing and Hematoxylin and Eosin Staining. In: *Methods in Molecular Biology [Internet].* 2014. p. 31–43. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1050-2\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-1050-2_3)
  86. Ferro AB. *Imunohistoquímica.* 2014.
  87. Lâminas X-Tra [Internet]. [cited 2018 Aug 15]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt/preparacao-das->

- amostras/laminas/laminas/detalhes/product/x-trar-slides/
88. Ramos-Vara JA. Principles and methods of immunohistochemistry. In: *Methods in Molecular Biology*. 2017.
  89. Dako. Immunohistochemical Staining Methods. In: *Education Guide*. 2009.
  90. BOND-III IHC e ISH totalmente automatizado [Internet]. [cited 2018 Aug 15]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt/ihc-ish/coloracao-avancada-de-ihq-e-his/detalhes/product/leica-bond-iii/>
  91. Dewax Solution Novocastra [Internet]. [cited 2018 Aug 16]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt/ihc-ish/bond-ancillary-ihc-ish-reagents/reagentes-auxiliares/detalhes/product/bond-dewax-solution/>
  92. Solução de recuperação de epítipo Bond 2 Novocastra [Internet]. [cited 2018 Aug 16]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt/ihc-ish/bond-ancillary-ihc-ish-reagents/reagentes-auxiliares/detalhes/product/bond-epitope-retrieval-solution-2/>
  93. Novolink DAB (polímero) Novocastra [Internet]. [cited 2018 Aug 16]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt/ihc-ish/reagentes-novocastra/tampoes-e-sistemas-de-deteccao/detalhes/product/novolink-dab-polymer/>
  94. Aumentador de DAB Bond Novocastra [Internet]. [cited 2018 Aug 16]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt/ihc-ish/bond-ancillary-ihc-ish-reagents/reagentes-auxiliares/detalhes/product/bond-dab-enhancer/>
  95. Kim SE, Paik HY, Yoon H, Lee JE, Kim N, Sung MK. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J Gastroenterol*. 2015;
  96. Pappas A, Lagoudianakis E, Seretis C, Koronakis N, Keramidaris D, Grapatsas K, et al. Role of lymphatic vessel density in colorectal cancer: prognostic significance and clinicopathologic correlations. *Acta Gastroenterol Belg* [Internet]. 2015 Jun;78(2):223–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26151692>
  97. Walgenbach-Bruenagel G, Tolba RH, Varnai AD, Bollmann M, Hirner A, Walgenbach KJ. Detection of lymphatic invasion in early stage primary colorectal cancer with the monoclonal antibody D2-40. *Eur Surg Res*. 2006;
  98. Huang C, Chen Y. Lymphangiogenesis and colorectal cancer. *Saudi Med J*. 2017;
  99. Enquist IB, Good Z, Jubb AM, Fuh G, Wang X, Junttila MR, et al. Lymph node-independent liver metastasis in a model of metastatic colorectal cancer. *Nat Commun*. 2014;
  100. Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O’Dwyer ST, et al. Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. *Colorectal Dis*. 2007;
  101. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer* [Internet]. 2000 Apr 1;88(7):1739–57. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%28SICI%291097-0142%2820000401%2988%3A7%3C1739%3A%3AAID-CNCR30%3E3.0.CO%3B2-T>
  102. Van Wyk HC, Roxburgh CS, Horgan PG, Foulis AF, McMillan DC. The detection and role of lymphatic and blood vessel invasion in predicting survival in patients with node negative operable primary colorectal cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2014.
  103. Akagi Y, Adachi Y, Ohchi T, Kinugasa T, Shirouzu K. Prognostic impact of lymphatic invasion of colorectal cancer: a single-center analysis of 1,616 patients over 24 years. *Anticancer Res* [Internet]. 2013 Jul;33(7):2965–70. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23780987>
104. Rozek LS, Schmit SL, Greenson JK, Tomsho LP, Rennert HS, Rennert G, et al. Tumor-Infiltrating lymphocytes, Crohn’s-like lymphoid reaction, and survival from colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016;
  105. Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: Dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World Journal of Gastroenterology.* 2009.
  106. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg.* 2004;
  107. Schoppmann A, Tamandl D, Herberger B, Längle F, Birner P, Geleff S, et al. Comparison of lymphangiogenesis between primary colorectal cancer and corresponding liver metastases. *Anticancer Res [Internet].* 2011 Dec;31(12):4605–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22199337>
  108. Zhou Y, Wang H, Gong H, Cao M, Zhang G, Wang Y. Clinical significance of perineural invasion in stages II and III colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2015;
  109. 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. *Oncol Lett.* 2017;
  110. Willis JE. The pathologist’s role in rectal cancer patient assessments. *Clinics in Colon and Rectal Surgery.* 2007.
  111. Hugen N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol [Internet].* 2014 Mar 1;25(3):651–7. Available from: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdt591>
  112. Oh BY, Park YA, Huh JW, Yun SH, Kim HC, Chun HK, et al. Prognostic Impact of Tumor-Budding Grade in Stages 1–3 Colon Cancer: A Retrospective Cohort Study. *Ann Surg Oncol.* 2018;
  113. Cacchi C, Arnholdt HM, Jähnig H, Anthuber M, Probst A, Oruzio D V., et al. Clinical significance of lymph vessel density in T3 colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2012;
  114. Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Shibao K, et al. Lymphatic Microvessel Density is an Independent Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum [Internet].* 2007 Mar;50(3):308–14. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003453-200750030-00005>
  115. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, Scapulatempo C, Alves VAF, Baltazar F, et al. Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. *Virchows Arch.* 2008;
  116. Wong SL. Lymph node counts and survival rates after resection for colon and rectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2009;
  117. Lu Y, Yang Q, Du Y, Feng G, Yang C. Expression analysis of lymphangiogenic factors in human colorectal cancer with quantitative RT-PCR. *Cancer Invest [Internet].* 2007 Sep;25(6):393–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882649>

## 8. ANEXOS

### Anexo I – Estadiamento do Cancro Colorretal

**Quadro 1** - Estadiamento do cancro colorretal, segundo a classificação TNM proposta pela American Joint Committee on Cancer (AJCC). (38)

<b>Estadio</b>	<b>Tumor Primário (T)</b>	<b>Nódulos Linfáticos Regionais (N)</b>	<b>Metástases à Distância (M)</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N2b	M0
<b>IIIA</b>	T1-T2	N2a	M0
	T1		
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N2b	M0
	T2-T3		
	T1-T2		
<b>IIIC</b>	T4a	N1-N2	M0
	T3-T4a		
	T4b		
<b>IVA</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1a
<b>IVB</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1b

**Nota:**

Tis: carcinoma in situ; T1: o tumor invade a submucosa; T2: o tumor invade a muscularis própria; T3: o tumor invade os tecidos pericoretales; T4a: o tumor invade a superfície do peritoneu visceral; T4b: o tumor invade diretamente outras estruturas e órgãos.

N0: Não existem metástases nos nódulos linfáticos; N1: Existem metástases em 1-3 nódulos linfáticos regionais; N2: metástases em 4 ou mais nódulos linfáticos regionais; N2a: metástases em 4-6 nódulos linfáticos regionais; N2b: metástases em 7 ou mais nódulos linfáticos regionais.

M0: Sem metástases distantes; M1a: metástases distantes confinadas a um órgão ou estrutura; M1b: metástases confinadas a mais de um órgão ou sítio ou no peritoneu.

## **Anexo II – Protocolo de Macroscopia**

**Quadro 2** - Protocolo de Macroscopia utilizado no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca.

<b>Reagentes</b>	<b>Tempo em Minutos</b>	<b>Temperatura em °C</b>	<b>Pressão/ Vácuo</b>	<b>Velocidade Agitador</b>	<b>Velocidade Gotejamento</b>
Formol	30	45°	Ambiente	Médio	30
Álcool 70%	25	45°	Ambiente	Médio	30
Álcool 96%	---	---	---	---	---
Álcool 99,5%	25	45°	Ambiente	Médio	30
Álcool 99,5%	25	45°	Ambiente	Médio	30
Álcool 99,5%	25	45°	Ambiente	Médio	30
Álcool 99,5%	50	45°	Ambiente	Médio	30
Álcool 99,5%	75	45°	Ambiente	Médio	30
Xilol	35	45°	Ambiente	Médio	30
Xilol	35	45°	Ambiente	Médio	30
Xilol	80	45°	Ambiente	Médio	30
Parafina	50	65°	Vácuo	Médio	30
Parafina	50	65°	Vácuo	Médio	30
Parafina	70	65°	Vácuo	Médio	30
<b>Transição de Reagentes</b>	25				
<b>Tempo Total</b>	10h01				

### **Anexo III – Protocolo de Coloração Hematoxilina e Eosina**

**Quadro 3** - Protocolo de coloração hematoxilina e eosina utilizado no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca.

<b>Reagente</b>	<b>Tempo em Minutos</b>
Xilol	02:30
Xilol	02:30
Álcool 99,9%	02:30
Álcool 99,9%	02:30
Álcool 96%	01:00
Água Corrente	01:00
Hemalast	00:30
Hematoxilina	05:00
Água Corrente	01:00
Diferenciador	00:45
Água Corrente	01:00
Bluing	01:00
Água Corrente	02:00
Álcool a 70%	01:00
Eosina	00:10
Álcool 99,9%	01:00
Álcool 99,9%	01:00
Xilol	02:00

## **Anexo IV - Protocolo de Imunohistoquímica (BOND-III Leica Biosystems)**

**Quadro 4** - Protocolo de imunohistoquímica utilizado no sistema automatizado BOND-III da Leica *Biosystems* presente no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca.

<b>Passos e Reagentes</b>	<b>Tempo em Minutos</b>	<b>Temperatura em °C</b>
1 e 2 - Bond Dewax Solution	0	72°
3 - Bond Dewax Solution		
4 a 6 – Álcool a 96%		Ambiente
10 a 13 – Bond Epitope Retrieval (ER) solution 2		100°
18 – Bond Wash Solution	3	Ambiente
19 – Peroxide Block	7	Ambiente
23 – Anticorpo Primário	20	Ambiente
28 – Pós Primário	8	Ambiente
29 a 32 – Bond Wash Solution	3 x 2 minutos cada	Ambiente
33 - Polímero	8	Ambiente
34 e 38 - Bond Wash Solution	2 x 2 minutos cada	Ambiente
39 - Água destilada		Ambiente
40 – Mixed DAB Refine		Ambiente
41 – Mixed DAB Refine	10	Ambiente
42 a 45 – água destilada		Ambiente
46 – Bond DAB Enhancer	10	Ambiente
47 a 50 – Água destilada		Ambiente
51 – Hematoxilina	6	Ambiente
52 e 56 – Água destilada		Ambiente
57 - Bond Wash Solution		Ambiente
58 – Água destilada		Ambiente

**Nota:** Todos os passos em falta no protocolo pertencem a lavagens com o reagente *Bond Wash Solution* durante 2 minutos.