Margareth da Rocha Fernandes

Contribuição ao estudo da influência da radiação ionizante pré-operatória sobre a marcação do linfonodo sentinela do reto com azul patente: estudo experimental em ratos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido

São Paulo

2005

Dedicatória

*Aos meus pais, Armindo e Nilda,
em reconhecimento a uma vida inteira de dedicação,
amor e confiança, sem medir esforços.*

*Ao meu marido, Fernando,
por todo o amor, companheirismo e dedicação,
contribuindo para que eu me tornasse uma pessoa
melhor e mais feliz.*

*Ao meu irmão, Marcio,
pela torcida e por ser o irmão mais amoroso que eu
poderia ter.*

*Aos meus padrinhos, Ivan (In Memoriam) e Odete,
pelo amor e dedicação como à filha que não tiveram.*

*Aos meus sogros, Mario e Helena,
pela acolhida, pela torcida e pelo amor como a uma
filha.*

Agradecimentos especiais

*Ao Prof. Dr. Orlando Marques Vieira,
que sempre me deu força e confiança para eu lutar
pelo meu sonho de ser cirurgiã.*

*Ao Prof. Dr. Renato Arioni Lupinacci,
meu mestre, que sempre acreditou em mim e sempre
me ajudou, e ajuda, a concretizar meu sonho de ser
cirurgiã.*

*Ao Prof. Dr. Nelson Fontana Margarido,
por toda a dedicação, pelo carinho, pela confiança, pela
orientação, pelo desprendimento e por acreditar
sempre e de forma incansável que tudo isso seria
possível. Qualquer palavra seria pequena para
agradecer a tudo e a tanto.*

Agradecimentos

Ao Dr. Fernando Tognato Ladeia, Diretor da Clínica de Radioterapia Dr. Oswaldo Peres, pela oportunidade e pelo apoio, cedendo gentilmente as instalações da referida Clínica para a realização da irradiação dos animais.

À física em Medicina, Regina Maria Godoy Lopes por todo o empenho, dedicação e orientação na irradiação dos animais.

A todos os técnicos da Clínica de Radioterapia Dr. Oswaldo Peres, que direta ou indiretamente participaram da confecção deste trabalho.

Ao Dr. Valcir Chiferi Jr, pelo grande apoio e orientação na análise histológica.

Ao Dr. Arnaldo Zanotto, pela análise estatística, pelo empenho e compreensão.

Ao Prof. Dr. Erasmo Magalhães Castro de Tolosa, pela oportunidade concedida.

À Dra. Maria Angela de Souza Ferreira, minha chefe, pela compreensão e apoio durante a elaboração da tese.

À Elias Aparecido Marcelino, pela fundamental e incansável colaboração com os animais.

À Maria Alice de França Rangel Rebello pela normatização da bibliografia.

À Sandra Maria da Silva Oliveira pelo empenho na preparação das lâminas da tese.

À Maria de Fátima Diniz pelo carinho e pelo apoio incansável na orientação das normas deste trabalho, junto à Pós-Graduação.

À Junko Takano Osaka pelas orientações e apoio.

À Marina Takeda Milani, Silvana Bueno Marques e Jonélia Souza de Perez pelo apoio e gentileza a mim dedicados.

A todos os colegas e funcionários que comigo trabalharam e que trabalham no Serviço de Cirurgia Geral e na Diretoria do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo.

Aos meus amigos.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO

2 OBJETIVO

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Linfonodo sentinela

3.2 Drenagem linfática do reto

3.3 Tumores colorretais e radioterapia

3.4 Apoptose

3.5 Bases biológicas da radioterapia – radiobiologia

3.6 Princípios físicos da radioterapia

4 MÉTODOS

4.1 Amostra principal

4.2 Grupos principais

4.3 Materiais utilizados

4.4 Irradiação

4.5 Campo de irradiação

4.6 Ensaio experimental da curva de calibração

(eleição da dose de irradiação e tempo de ação actínica
constatados por histologia)

4.7 Demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato

4.8 Preparo das lâminas

4.9 Avaliação histológica

4.10 Variáveis escolhidas

4.11 Análise estatística

5 RESULTADOS

5.1 Resultados principais

5.2 Resultados associados (em função das doses de radiação e tempo de demarcação-curva de calibração)

5.3 Resultados histológicos principais

5.4 Resultados histológicos associados (curva de calibração)

6 DISCUSSÃO

7 CONCLUSÃO

8 ANEXOS

9 REFERÊNCIAS

Resumo

Fernandes M R. **Contribuição ao estudo da influência da radiação ionizante pré-operatória sobre a marcação do linfonodo sentinela do reto com azul patente . Estudo experimental em ratos.** [tese]. São Paulo : Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

O mapeamento linfático é empregado para melhorar o estadiamento e terapêutica dos tumores. A importância da pesquisa do linfonodo sentinela no tratamento do melanoma e no câncer de mama, já está estabelecida. A radiação ionizante prévia promove alterações actínicas em tecidos peritumorais, o que poderia influenciar a demarcação do linfonodo sentinela, e comprometer a adoção desse novo conceito, para o tratamento do câncer de reto. O presente estudo desenvolveu modelo experimental para demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato e definiu a dose de radiação ionizante cobalto 60 adequada para desenvolver alterações teciduais, através da criação de curva de calibração. O objetivo foi avaliar a influência da radiação ionizante pré-operatória sobre a marcação, com a utilização do corante azul patente, do linfonodo sentinela do reto de ratos. A amostra foi constituída por 40 ratos machos Wistar e dividida em 2 grupos: Grupo 1 (controle não irradiado; n=20) e Grupo 2 (irradiado com 1200cGy e demarcado 2 dias após; n=20). O modelo experimental da curva de calibração utilizou 2 grupos: Grupo 3 (irradiado com doses variadas e linfonodos sentinelas demarcados 2 dias após; n=18); e Grupo 4 (irradiado com doses de 300cGy a 1200cGy e demarcados após 7 dias; n=16). O intervalo de 7 dias entre a irradiação e a demarcação foi suficiente para repopulação do

linfonodo e da mucosa do reto. As variáveis escolhidas foram: tempo de coloração do linfonodo; presença ou não do linfonodo corado; atrofia da mucosa do reto; e depleção linfocitária. Foi observado aumento linear do intervalo de tempo de coloração do linfonodo no Grupo 2. Estas variáveis eram mais intensas na dose de 1200cGy. Concluindo, a irradiação pré-operatória não influenciou na demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato.

Descritores: Biópsia de linfonodo sentinela/métodos; Linfonodo/cintilografia; Linfonodo/irrigação sangüínea; Linfonodo/efeitos de radiação; Metástase linfática/diagnóstico; Metástase linfática/radioterapia; Mapeamento por restrição/métodos; radiação ionizante; Neoplasias retais/irrigação sangüínea; Radioterapia; Tinturas/uso diagnóstico; Ratos Wistar.

Summary

Fernandes MR. **Contribution to the study of the influence of preoperative ionizing radiation on the identification of the sentinel lymph node with patent blue. An experimental study in rats** [thesis]. São Paulo: “ Faculdade de Medicina , Universidade de São Paulo “ ; 2005.

Lymphatic mapping is employed to improve the staging and the therapy of tumors. The importance of the search for the sentinel lymph node in melanoma and in breast cancer is already established. Previous ionizing radiation induces actinic alterations in peritumoral tissues and thus might influence the localization of the sentinel lymph node and compromise the adoption of this new concept in the treatment of cancer of the rectum. The present study developed an experimental model for the localization of the sentinel lymph node of the rectum of the rat and defined the dose of ionizing radiation (cobalt 60) adequate to produce tissue alterations through the creation of a calibration curve. The objective was to evaluate the influence of preoperative ionizing radiation on the staining of a patent blue dye in the sentinel lymph node of the rectum in rats. The sample was composed of 40 male Wistar rats and was divided in two groups: Group 1 (non-irradiated control; n = 20) and Group 2 (irradiated with 1200cGy and stained 2 days afterwards; n = 20). The experimental model of the calibration curve used 2 groups: Group 3 (irradiated with varied doses and sentinel lymph nodes stained 2 days afterwards; n = 18) and Group 4 (irradiated with 300cGy to 1200cGy and stained 7 days afterwards; n = 16). The 7-day interval between irradiation and staining was sufficient to allow the re-population of the lymph node and the rectal mucosa. The chosen variables were: timing of the

staining of the lymph node; absence or presence of a stained sentinel lymph node; atrophy of the rectal mucosa and lymphocyte depletion. It was observed a linear increase in the time interval for the staining of the lymph in Group 2. These variables were more intense at the 1200cGy dose. In conclusion, preoperative irradiation did not influence the staining of the sentinel lymph node of the rectum in rats.

Descriptors: Sentinel lymph node biopsy/methods; Lymph nodes/radionuclide imaging; Lymph nodes/blood supply; Lymph nodes/radiation effects; Lymphatic metastases/diagnostic; Lymphatic metastases/radiotherapy; restriction mapping/methods; Ionizing radiation; Rectal neoplasms/blood supply; Radiotherapy; Dyes/diagnostic use; Wistar rats.

1 - INTRODUÇÃO

O uso do mapeamento linfático é motivo de estudo com o objetivo de melhorar o estadiamento do câncer e identificar os pacientes que podem se beneficiar com a radioterapia e quimioterapia adjuvante.

O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo que recebe a drenagem linfática proveniente de determinados tipos de câncer (URBAN et al , 2001).

RAMÓN CABANAS , em 1969, em sua tese de graduação na Universidad Nacional de Assunción Facultad de Ciências Medicas no Paraguai, foi o primeiro autor a despertar o interesse em estudar a drenagem linfática nas neoplasias malignas, com o objetivo de encontrar indicadores que definissem, com precisão, a necessidade do esvaziamento linfonodal. CABANAS, em 1977, estudou diferentes tipos de tumores, incluindo pênis, mama, melanoma, testículo, reto, ânus e linfomas. O interesse especial foi destacado pelas lesões malignas de pênis, quando injetou corante no dorso do órgão e constatou a coloração da cadeia limitada de linfonodos, localizada superficialmente na região inguinal. O principal mérito do autor foi destacar os princípios básicos do procedimento, para o entendimento dessa nova idéia dentro da cirurgia oncológica.

MORTON e colaboradores (1992), estabeleceram a importância do conceito de linfonodo sentinela no tratamento do melanoma. GIULIANO e colaboradores (1994), aplicaram o mesmo conceito no câncer de mama.

Através destes estudos, observou-se que os primeiros ("sentinelas") linfonodos que recebiam a drenagem linfática do tumor primário seriam os que mais provavelmente conteriam as metástases, e assim poderiam prever o estado de comprometimento linfonodal do paciente (JOOSTEN et al., 1999). A avaliação dos linfonodos nortearia o prognóstico e as condutas cirúrgico-terapêuticas específicas para cada paciente.

BILCHIK e colaboradores (1998) e SAHA e colaboradores (2000), aplicaram a técnica de identificação de linfonodos sentinelas nos pacientes com câncer colorretal. Assim como no melanoma e no câncer de mama, o mapeamento linfático no câncer colorretal não é utilizado para limitar a extensão da linfadenectomia, e sim para melhorar o estadiamento através da obtenção de ultraestadiamento, pelo exame minucioso dos linfonodos sentinelas.

SAHA e colaboradores (2000) e WOOD e colaboradores (2001), utilizaram a técnica de mapeamento linfático com o corante azul patente, injetado na submucosa do tumor retal, seguindo preferencialmente a via linfática de drenagem do tumor primário. O objetivo de mapear os linfonodos sentinelas foi atingindo em mais de 90% dos casos estudados durante o ato cirúrgico, sendo marcado os linfonodos corados e analisados posteriormente através da histopatologia (estadiamento anatomopatológico).

A utilização da radiação ionizante, como a radioterapia em pacientes com tumores de reto tem demonstrado a capacidade de redução tumoral permitindo a ressecção de tumores antes considerados

irressecáveis (NADALIN et al., 1999). A maioria dos autores (NIVATVONGS et al., 1999 ; ADELL et al., 2001) considera que o controle local é significativamente melhor nos pacientes irradiados, porém, não é possível afirmar a respeito do aumento dos índices de sobrevida em cinco anos. O campo de irradiação deve ser dirigido ao leito tumoral delimitado e às primeiras estações de drenagem linfática, o que propicia índices melhores de controle local (NIVATVONGS et al., 1999).

O momento da utilização da radioterapia nos casos de tumores de reto demonstra vantagens no pré-operatório tais como a diminuição do risco de disseminação ou implante de células neoplásicas pelo manuseio cirúrgico, além do menor risco de reações actínicas . Entretanto, no pós-operatório, a radioterapia apresenta vantagens, tais como, a certeza quanto ao estadiamento, a possibilidade de demarcação das áreas de doença residual e a preparação cirúrgica da cavidade abdominopélvica para posterior radioterapia . A morbidade relativa ao tratamento é mais baixa quando a radioterapia é utilizada no pré-operatório e, conseqüentemente mais alta no pós-operatório (KODNER ; MYERSON, 2000) .

A interação da radiação ionizante com o meio biológico inicia-se como processo físico e evolui para os estágios físico-químicos e biológico na manifestação de seus efeitos, podendo causar diversos níveis de dano celular, desde pequenos traumas que se auto-reparam, passando por disfunções celulares, mutações, carcinogênese e até morte celular. A maioria destes danos é ácido desoxirribonucléico (DNA) ou ácido

ribonucléico (RNA) dependente, que podem ser lesados de maneira direta pela radiação ou mais freqüentemente por ação secundária da formação de radicais livres oriundos da ionização de água intracelular (LEHNERT , 1999).

O dano celular decorrente de radioterapia pré-operatória, de acordo com sua intensidade, pode interferir ou não nas condições teciduais locais, tanto na neoplasia quanto em áreas circunvizinhas, nas quais estão certamente albergadas as primeiras estações de drenagem linfática.

As alterações actínicas ocorridas em tecidos peritumorais, poderiam influenciar na demarcação do linfonodo sentinela, o que comprometeria a adoção desse novo conceito para o tratamento do câncer de reto, visando ao prognóstico mais preciso e a escolha de uma terapêutica adjuvante superior.

2 – OBJETIVO

2 – OBJETIVO

O presente estudo experimental tem por objetivo avaliar a influência da radiação ionizante pré-operatória sobre a marcação, com a utilização do corante azul patente, dos linfonodos sentinelas do reto de ratos.

3 – REVISÃO DA LITERATURA

3 – REVISÃO DA LITERATURA

Considerando que a Revisão da Literatura deverá contemplar diferentes temas, iremos fazê-la por assuntos distintos.

3.1 Linfonodo sentinela

O conceito de linfonodo sentinela está fundamentalmente baseado na progressão ordenada das células tumorais através do sistema linfático (KIRICUTA, 2000). O linfonodo sentinela é um linfonodo específico ou uma cadeia de linfonodos que recebem primeiro a drenagem linfática do tumor primário e correspondem ao principal sítio de metástases do tumor. O mapeamento dos linfonodos sentinelas pode determinar melhor o estadiamento dos tumores, através da identificação das micrometástases, bem como contribuir para novos conceitos nos tratamentos cirúrgico e radioterápico dos pacientes com câncer. A associação de procedimentos cirúrgicos que aumentam a morbidade, como linfadenectomias mais extensas, ou tratamentos radioterápicos mais agressivos, podem interferir diretamente na eficácia do tratamento e conseqüentemente na sobrevida dos pacientes (KIRICUTA, 2000). Segundo este mesmo autor, o conceito de linfonodo sentinela revolucionou o tratamento do câncer de mama precoce. A biópsia do linfonodo sentinela é método minimamente invasivo e de alta acurácia no estadiamento dos pacientes, e pode efetivamente

reduzir a morbidade e o custo do tratamento, evitando linfadenectomia axilar completa desnecessária. A detecção do linfonodo sentinela contribui para definição da estratégia da terapia adjuvante utilizada, com baixas taxas de complicação. A identificação do padrão de drenagem linfática individual permite a irradiação do complexo linfático locorregional para cada paciente.

O reto possui 3 a 4 linfonodos sentinelas que podem ser detectados através do mapeamento linfático, utilizando corante ávido pela corrente linfática. Segundo WOOD e colaboradores (2001), o mapeamento pode ser realizado através da utilização do corante azul patente, injetado na submucosa do tumor retal. Uma das limitações desta técnica está relacionada com a falha do mapeamento linfático nos tumores retais abaixo da reflexão peritoneal.

Segundo SAHA e colaboradores (1999), a identificação dos linfonodos sentinelas e das micrometástases neles contidas, melhora o resultado do estadiamento dos tumores colorretais. O correto estadiamento interfere na escolha terapêutica, tanto no tipo de cirurgia quanto na quimiorradioterapia adjuvante, com conseqüente resultado superior do tratamento proposto.

MALI e colaboradores (2005) descreveram o método de mapeamento e biópsia de linfonodo sentinela em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de canal anal em duas etapas: em primeiro lugar foi administrado um radioisótopo, tecnécio 99m, ao redor do tumor e procedida a linfocintilografia. Foi observado a drenagem linfática da região

e detectado o acúmulo focal do radiotraçador em determinada topografia, com marcação na pele do paciente. Em segundo lugar, com o paciente anestesiado, o estudo foi complementado com a injeção do azul patente peritumoral e com a utilização do “gama-probe”, seguido da biópsia do linfonodo sentinela inguinal. Este método permitiu estadiamento mais acurado da região inguinal e melhor planejamento terapêutico.

SEID e colaboradores (2005) verificaram o número, tamanho e a distribuição topográfica dos linfonodos no mesorreto aplicando a técnica de Excisão Total do Mesorreto (ETM) em retos normais de 17 cadáveres. Após a retirada do reto, separava-se a gordura perirretal em monobloco, dividindo-se em 9 regiões que eram colocadas em formol a 10%. Após 24 horas, estas eram submetidas a estudo anatomopatológico convencional (hematoxilina-eosina) para identificação e mensuração dos linfonodos. O número médio de linfonodos observado em retos normais de cadáveres foi de aproximadamente 5, preferencialmente na face posterior do mesorreto, com tamanho médio inferior de 0.5cm.

3.2 Drenagem linfática do reto

A drenagem linfática dos segmentos médio e superior do reto ascende pela cadeia linfática da artéria retal superior e subsequente para os linfonodos mesentéricos inferiores. O segmento inferior do reto drena em direção cranial para os linfonodos mesentéricos inferiores e

lateralmente via linfáticos retais médios, cadeia ilíaca interna e linfonodos pré-sacrais (NIVATVONGS et al., 1999).

Os estudos mais recentes sobre drenagem linfática do reto são realizados através de linfocintilografia, com a utilização da injeção de radiocolóide, rastreado através de gama câmara. A linfocintilografia demonstra a drenagem linfática proximal, ao longo dos vasos mesentéricos inferiores (NIVATVONGS et al., 1999).

A drenagem linfática retrógrada do câncer retal é pouco comum, a menos que os linfonodos proximais estejam bloqueados ou que o carcinoma seja pouco diferenciado. A disseminação para linfonodos inguinais não ocorre, a menos que o tumor invada a linha pectínea (NIVATVONGS et al., 1999).

3.3 Tumores colorretais e radioterapia

A incidência de câncer colorretal nos diversos países é variável, registrando-se coeficientes desde 3,4 casos por 100.000 habitantes na Nigéria, e até 35,8 casos por 100.000 habitantes em Connecticut, EUA (NADALIN et al 1999).

Os melhores indicadores de prognóstico nos tumores colorretais são o comprometimento dos linfonodos (localização e número) e o grau de infiltração da parede do colon ou do reto. A presença de um desses fatores não é tão ruim quanto a presença dos dois. O grau de diferenciação também é fator prognóstico por estar relacionado com a presença de

comprometimento dos linfonodos, número de linfonodos comprometidos, invasão vascular linfática e sangüínea, grau de infiltração de parede do órgão e metástase à distância (NADALIN et al., 1999).

A radioterapia tem indicação para diminuir a incidência de recidiva locorregional, nos casos de recidiva e nos tumores extensos para aumentar a ressecabilidade dos mesmos (LICHTER ; LAWRENCE, 1995).

A radioterapia como tratamento isolado tem demonstrado a capacidade de redução tumoral, permitindo a ressecção de tumores antes considerados irresssecáveis. Embora alguns trabalhos sugerissem aumento nos índices de sobrevida de cinco anos, estes dados não foram confirmados posteriormente. O controle local é significativamente maior nos pacientes irradiados. A dose necessária para reduzir o tumor é de 4.500 centigrays, em quatro a seis semanas (NADALIN et al., 1999).

MINSKY e colaboradores (1991), relatam que 58% dos pacientes com tumores irresssecáveis tratados com radioterapia, foram submetidos a cirurgia com margens negativas.

Segundo FEIG e colaboradores (1999), as maiores vantagens da radioterapia no pré-operatório, estão em diminuir o risco de disseminação ou implante de células neoplásicas pelo manuseio cirúrgico e, principalmente, o menor risco de seqüelas actínicas. É aceito como menor o risco de complicações da radioterapia pré-operatória, haja vista que as mais graves seqüelas situam-se ao nível do intestino delgado. A mobilidade das alças intestinais permite que os mesmos segmentos não sejam constantemente irradiados.

Entretanto, no pós-operatório, as vantagens da realização da radioterapia são a certeza quanto ao estadiamento, a possibilidade de demarcação das áreas de doença residual e a preparação cirúrgica da cavidade abdominopélvica para posterior radioterapia.

O câncer colorretal é uma das doenças malignas mais estudadas com relação a fatores prognósticos genéticos e moleculares. A relação destes fatores com o prognóstico da doença pode acarretar implicações nas opções do tratamento cirúrgico e no tratamento adjuvante com quimio-radioterapia (FERNÁNDEZ-CEBRIÁN et al., 2005).

3.4 Apoptose

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular representado por características bioquímicas e morfológicas distintas que compreendem ativação de endonucleases, condensação e marginação de cromatina, e fragmentação e redução celular (MILAS et al., 1994).

O papel da apoptose é regulação homeostática, essencial na manutenção da renovação dos tecidos. O processo é controlado pela interação de genes e hormônios tecido-dependentes ou fatores de crescimento. Recentes estudos identificaram genes reguladores de apoptose, tais como bcl-2, c-myc e p53. Evidências experimentais sugerem que a apoptose exerce importante papel na regulação do crescimento tumoral e na resposta da neoplasia aos diversos tipos de

terapias de combate ao câncer, tais como radioterapia e quimioterapia (MILAS et al., 1994).

A regulação da apoptose é mecanismo promissor na melhora da resposta terapêutica do tumor, através de aumento da resposta apoptótica dos tecidos tumorais e redução da mesma resposta dos tecidos normais (MILAS et al., 1994).

A apoptose é processo ativo de controle molecular. A regulação deste tipo de morte celular pode contribuir para o desenvolvimento de mecanismos mais eficazes de eliminação de populações de células malignas (MARTIN et al., 1994).

Defeitos na regulação da apoptose contribuem para diversos processos patológicos, tais como desenvolvimento de tumores, doenças inflamatórias crônicas ou desordens imunológicas (KLEILB et al., 2002).

A apoptose desenvolve-se rapidamente, em horas, após tratamento citotóxico, e é dose dependente. A resposta apoptótica está muito relacionada com a eficácia antitumoral da radioterapia e quimioterapia, e funciona como fator prognóstico da resposta do tumor ao tratamento. Os tumores variam sua resposta apoptótica a agentes citotóxicos, sendo os carcinomas mais responsivos do que os sarcomas. Além da resposta heterogênea entre os diferentes tipos histológicos de tumores, existem diferenças dentro do mesmo tipo de tumor no tocante à indução à apoptose, o que corrobora com a idéia da existência de regulação genética da apoptose (MILAS et al., 1994).

ADELL e colaboradores (2001), estudaram a interação entre a apoptose e a resposta do carcinoma retal com ou sem radioterapia pré-operatória por curto prazo. Os pacientes com índice apoptótico alto (apoptose identificada pelo método TUNEL) apresentaram taxas de recorrência local baixas. Os pacientes irradiados no pré-operatório obtiveram redução na taxa de recorrência local. No grupo de índice apoptótico alto não houve diferença estatisticamente significativa entre os pacientes irradiados e os não irradiados no pré-operatório.

O método TUNEL permite a detecção de apoptose de pontos de quebra por “DUTP-biotina”, mediada por desoxinucleotidil terminal-transferase. Este método determina o índice de proliferação celular através da quantificação de células através da quantificação de células marcadas por reação imuno-histoquímica para DNA topoisomerase II alfa , e a expressão de proteínas associadas ao ciclo celular (ARIAS, 2002).

A apoptose influencia na sensibilidade dos tumores à radioterapia e quimioterapia(HASEGAWA et al., 2002). Microscopicamente, a apoptose é caracterizada por alterações morfológicas que resultam na formação de anticorpos anti-apoptose (KLEILB et al., 2002).

Segundo MARIJEN e colaboradores (2003), a apoptose induzida por radiação diminui a recidiva local e a sobrevida, mas não funciona como fator prognóstico no câncer retal, haja vista que a proliferação tumoral é alta e a agressividade do tumor é determinada pelo número de células apoptóticas espontâneas.

A sensibilidade intrínseca dos tecidos normais e tumorais à radiação é fator determinante na resposta à radioterapia. O aumento da eficácia terapêutica da radiação ionizante e a redução de efeitos colaterais mediados pela radiação são objetos de estudo da modulação específica de mecanismos de morte celular específica (DUNNE et al., 2003; MARINI e BELKA, 2003; BELKA et al., 2004).

3.5 Bases biológicas da radioterapia - radiobiologia

Os danos experimentais, induzidos pela radiação ionizante no ácido desoxirribomuclicó (DNA), facilitaram o entendimento dos efeitos sub e potencialmente letais e do mecanismo utilizado para repará-los (DEL REGATO, 1976 ; PEREZ ; BRADY, 1998), criando base racional para manipulação dos fatores tempo e dose.

A Radiobiologia contribuiu, sobremaneira, para o entendimento da teoria da morte celular em função do aumento da dose como agente citotóxico, além da demonstração do mecanismo de reparo celular, quando o efeito induzido pela radiação ionizante era sub ou potencialmente letal (WEICHSELBAUM ; LITTLE, 1982 ; FOWLER, 1983 ; ELKIND, 1990).

Os efeitos biológicos, causados nas células pela radiação, são estudados pela Radiobiologia . O efeito biológico ocorre quando a energia absorvida pelo meio é suficiente para quebrar ligações químicas estáveis, como as do DNA, que acarretarão efeitos químicos e biológicos (HALL 2000).

A radiação ionizante , do ponto de vista radiobiológico, atua no reparo dos danos sub e potencialmente letais, na repopulação celular entre as frações, na redistribuição no ciclo celular e na reoxigenação (CATER; SILVER, 1960; MOSS et al., 1979).

O dano letal é aquele considerado irreparável, irreversível levando a morte celular. O dano subletal ocorre quando a morte celular não é imediata, haja vista que as células podem ser reparadas isoladamente. Caso haja número grande de células que não forem reparadas após a 2ª ou mais frações de radiação, a morte celular pode ocorrer. O reparo da lesão subletal (RLSL) é utilizado para descrever a resposta dos tecidos normais que sobreviveram mesmo após terem sido submetidas a hiperfracionamento (a dose convencional é dividida em duas ou três num mesmo intervalo de tempo). O dano potencialmente letal é aquele que pode ser modificado após manipulação ambiental. Este tipo de dano pode perder sua eficiência caso a divisão celular for retardada por 6 ou mais horas (LEIBEL ; PHILLIPS, 1998).

Segundo MARTELLA (1998), os tecidos normais têm capacidade muito grande de recuperação dos efeitos sub ou potencialmente letais, induzidos pela radiação ionizante até o nível de tolerabilidade da dose. Esses danos também podem ser causados por lesões nas microvasculaturas e nos tecidos de sustentação , ou seja, as células do estroma.

A terapia com radiação provoca extensa apoptose das células endoteliais microvasculares da lamina própria. Esta é a primeira lesão observada pelo dano da radiação intestinal após radioterapia abdominal (CHO et al., 2004 ; HADDAD et al, 1999).

A Radioterapia é tratamento adjuvante efetivo para o câncer retal com poucos efeitos colaterais. Ela exerce efeitos mais profundos nas células tumorais do que nas células normais. NAGTEGAAL e colaboradores (2005) analisaram os efeitos da irradiação sobre a expressão genética dos tecidos normais e tumorais de pacientes com câncer retal e concluíram que diferenças pré-existentes na expressão genética entre os mesmos podem explicar diferenças nas respostas à radiação, com efeitos clínicos benéficos da radioterapia nas células tumorais (baixa taxa de recorrência local) e poucos efeitos nos tecidos normais (efeitos colaterais menores).

Com relação às características físicas das radiações ionizantes, elas classificam-se em: corpusculares e eletromagnéticas. Ao interagir com o meio absorvedor, elas transferem aos elétrons do meio quantidade de energia suficiente para arrancá-los do átomo, caracterizando a ionização. Esta ionização pode ocorrer no tecido tumoral ou no meio circunvizinho ao tumor (JOHNS ; CUNNINGHAM, 1974a).

Os efeitos biológicos da radiação ionizante podem ser diretos ou indiretos. A interação que ocorre diretamente com componentes celulares, proteínas e lipídios e acarreta alterações estruturais é considerada como efeito direto e são responsáveis por 30% dos efeitos biológicos da

radiação. O efeito é considerado indireto quando a interação ocorre no meio onde as células ou seus constituintes estão diluídos ou seja, a água, produzindo radicais livres. Eles são responsáveis por 70% das interações (KHAN, 1994a).

Os sistemas enzimáticos que percorrem a dupla fita do DNA conseguem reconhecer e reparar uma ruptura isolada de uma ligação química da molécula. A dificuldade para reconhecer e reparar diminui com o aumento da quantidade, tipo e redução da distancia. A resposta biológica após a irradiação pode originar grande número de mudanças: quebras duplas do DNA, quebras e rearranjos cromossômicos, translocação de moléculas lipídicas na membrana, sistema de transdução, morte por apoptose ou por divisão celular, mutação, carcinogênese (KHAN, 1994b).

COHEN (1966 e 1968), postulou que um modelo matemático de resposta à radiação dos tecidos normais e dos tumores deveria levar em consideração pelo menos três componentes exponenciais : dano único irreversível, dano múltiplo, produzindo uma inativação com conseqüente reparo precoce, e a repopulação celular.

DUTREIX e colaboradores (1973), resgataram um conceito descrito por READ (1959), onde a curva de sobrevida deveria ser baseada em um modelo linear e quadrático, no qual o componente linear seria o não reparável , e o quadrático referente às células mortas após algum reparo. O modelo linear quadrático é o mais utilizado, pois considera dois componentes que serão a chave para a morte celular: um é proporcional a

dose que representa as mortes celulares ocasionadas por danos letais e outro componente é proporcional ao quadrado da dose, relacionado a danos letais.

Com o advento da biologia molecular, novos e promissores conceitos estão surgindo para a compreensão dos fenômenos biológicos conseqüentes à exposição à radiação ionizante. Destes novos conceitos, quatro podem ser destacados : a radiação interagindo com o ciclo celular; a radiação induzindo a expressão do gene; a radiação alterando o sinal da tradução DNA-RNA e a radiação alterando o micro ambiente tumoral (MARTELLA et al., 1996).

No ciclo celular, existem 4 fases : M (mitose), G1 , S (síntese de DNA) e G2 . As alterações radioinduzidas são mais sensíveis na fase de mitose (M) , pois existe grande probabilidade da lesão ser fixada (LICHTER ; LAWRENCE, 1995). A fase de síntese (S) do ciclo celular é considerada a menos sensível à radiação . Nesta fase, ocorre a duplicação do conteúdo genético, o que permitiria a atuação de mecanismos de reparo (GOMES ; LEITÃO, 1986 ; BOMFORD et al., 1993). O intervalo entre as fases G2 e “M” do ciclo celular apresenta atraso quando exposta à radiação ionizante, provavelmente devido ao reparo da lesão radioinduzida (LICHTER ;LAWRENCE, 1995) . Quando esse atraso não é observado , a radiosensibilidade é maior (MAITY et al., 1997). Entre as fases G1 e de síntese (S) atraso também é observado após irradiação , relacionado com a replicação do DNA (KASTAN et al., 1992). Este atraso poderia ser conseqüência do aumento da expressão do gene p53 e dos

genes p53 dependentes e o resultado seria um reparo do DNA ou a entrada da célula em apoptose.

O gene p53 é um gene supressor de tumor em sua forma primitiva, responsável pela indução do processo de apoptose. A maioria dos trabalhos da literatura consultada referente ao estudo da proteína supressora de tumor p53 foram realizados com o objetivo de estudar o prognóstico da diferenciação (CAMARGO et al., 1997) e sua conseqüente agressividade.

A radiação provoca pausas transitórias no ciclo celular. As células podem ser bloqueadas no final de G1, durante a fase S ou em G2. Estes pontos são os pontos de controle do ciclo celular. Quando o DNA é danificado, um dos pontos de controle é danificado para prevenir a progressão do ciclo celular, impedindo, assim, que a célula replique um DNA danificado ou que venha a segregar um cromossomo errôneo (LEHNERT, 1999).

3.6 Princípios físicos da radioterapia

O uso terapêutico da radiação ionizante iniciou-se quase que imediatamente após sua descoberta, e o primeiro relato de seu uso ocorreu em janeiro de 1896 (*apud* GUNILLA, 1996), quando uma paciente com carcinoma de mama foi tratada.

A Comissão Internacional de Unidade de Medida Radiológica (ICRU), em 1928, adota formalmente como unidade de radiação o “Roentgen”, cujo símbolo é “R”, definido como “a quantidade de raios x ou gama que associado a emissão corpuscular em um centímetro cúbico de ar, produz íons de ambos os sinais, que carregam uma unidade eletrostática de carga em condições normais de temperatura e pressão”, e, em 1953 (*apud* GUNILLA, 1996), essa mesma comissão recomendou, como unidade de dose absorvida o “Rad” (dose de irradiação absorvida) que, por utilizar como base o sistema “c.g.s.” (centímetro.grama.segundo), foi modificado para “Gray” (Gy) que utiliza como base o sistema “m.k.s.” (metro.kilograma.segundo), universalmente aceitos até os dias de hoje.

O conceito de Gray corresponde à unidade de medida da dose absorvida. Conhecida até alguns anos atrás como RAD, foi criada para que representasse a unidade no sistema internacional de medidas $1\text{Gy} = 1\text{Joule/kg}$. Didaticamente 1cGy equivale a 1 RAD. Um Rad equivale a uma transferência de energia de 100 ergs por grama de tecido irradiado, e um cGy (centigray) equivale a 10 a menos, 2 joules por quilograma de tecido irradiado (SCAFF, 1997).

A aplicação clínica das radiações ionizantes como terapêutica, de início, foi baseada no empirismo (MARTELLA, 1998).

Nos últimos quarenta anos, grandes esforços foram feitos no sentido de desenvolver o potencial de uso dos conceitos radiobiológicos, para que a radioterapia pudesse ser utilizada com mais segurança e efetividade

(BUSCHKE, 1962). Radiobiologistas e radioterapeutas trabalharam muito próximo para entender e descrever os fenômenos biológicos produzidos pela radiação ionizante (BUSH, 1982).

Princípios físicos e biológicos que permitem avaliar a dose dia e seu fracionamento são estudados através da interação da radiação ionizante com a matéria e envolve a Física e a Radiobiologia como partes importantes de todo o processo que envolve a Radioterapia, uma estudando os fenômenos de interação da radiação com a matéria e a outra as respostas biológicas dos tecidos irradiados (KHAN et al., 1994a).

A Teleterapia é o segmento da radioterapia de aplicabilidade no presente estudo . A definição de Teleterapia baseia-se na localização da fonte emissora de radiação. Quando a fonte encontra-se longe do tecido alvo, caracteriza-se a teleterapia (FLINTON, 1998).

Na década de 50 surgem as primeiras unidades de Cobalto emissoras de radiação gama e os primeiros aceleradores lineares emissores de Raios X ou fótons. Os fótons produzidos têm energia de 3MV, muito próxima a das unidades de Cobalto. A escolha sobre o equipamento recaia em face ao fator econômico, uma vez que ambos ofereciam energia de tratamento muito próxima. Somente por volta dos anos 60 é que os aceleradores passam a ser preferidos. As energias agora podem ser maiores, apresentam feixes duais de fótons e elétrons, e características dosimétricas mais interessantes que as das unidades de Cobalto. No final do século XX o avanço tecnológico aprimora os

colimadores que passam a ser independentes ou ter a opção de múltiplas folhas, agilizando e melhorando o processo de colimação. Este fato permite o desenvolvimento de outras formas de tratamento como é o caso da terapia conformada e da intensidade modulada (KHAN et al., 1994b ; JOHNS e CUNNINGHAM 1974b).

Na radioterapia, o conceito mais importante é a morte celular, definida como sendo a perda da capacidade de gerar descendentes viáveis. Outros conceitos norteiam o planejamento do tratamento dos pacientes com diversos tipos de tumores e o cálculo das doses necessárias. Quanto mais alta for a dose utilizada, maior a probabilidade que ocorra o controle local do tumor. A dose de radiação deve ser diretamente proporcional ao tamanho do tumor. Tumores mais extensos podem ser tratados com reforço de dose (“boost”), para melhorar o controle local. As células hipóxicas que se encontram na parte mais central do tumor são consideradas radorresistentes. A dose necessária para que haja a morte deste tipo de células é extremamente grande. A remoção cirúrgica auxilia na diminuição da dose e aumenta a probabilidade do controle tumoral (KHAN ; POTISH, 1998).

As complicações e a morbidade da radioterapia estão relacionadas com o volume irradiado. Consequentemente, pequenos volumes toleram doses maiores de radiação com menor potencial de morbidade. Quanto menor a dose nos tecidos normais, vizinhos ao tumor, menor a morbidade associada (PEREZ ; GLASCON, 1992).

4 – MÉTODOS

4 – MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no LIM – 26 , Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Serviço do Prof. Dr. Erasmo Magalhães Castro de Tolosa) e o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Todo o desenvolvimento da pesquisa foi em conformidade com as Normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

O presente estudo adota modelo experimental para mapeamento de linfonodos sentinelas do reto de rato, além de desenvolver a definição de dose de radiação ionizante do tipo gama (cobalto) adequada para desenvolver alterações teciduais, bem como o melhor tempo de constatação dessas alterações no segmento estudado (curva de calibração).

4.1 Amostra principal

Foram submetidos ao estudo 40 ratos machos , variedade Wistar, provenientes da Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa – Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com peso médio de 301 gramas , peso mínimo de 255 gramas e peso

máximo de 424 gramas.

Os ratos foram alimentados com ração padrão e água “*ad libitum* “. Permaneceram em jejum de 12 horas para ração e de 6 horas para líquidos, antes da indução anestésica, quer por ocasião da radiação ionizante, quer por ocasião da marcação do linfonodo sentinela do reto com azul patente.

4.2 Grupos principais

A amostra foi dividida por sorteio prévio, em dois grupos de 20 animais em cada, assim distribuídos:

- Grupo **1** : Grupo controle não irradiado, com linfonodo marcado (n = 20)
- Grupo **2** : Grupo irradiado com 1200cGy e com linfonodo marcado 2 dias após (n= 20)

4.3 Materiais utilizados

Para a realização do presente experimento foram necessários os seguintes materiais :

- corante azul patente V a 2,5 % - empresa: Guerbet * - ampola: 2 mililitros
- seringa BD ultra-fine II - agulha curta, de 8mm de comprimento e 0,3mm de calibre (30g);

- anestésico: Xilazina a 2 % e Cetamina 50 mg/ml
- povidine tintura;
- cronômetro;
- câmera fotográfica Canon : EOS 5000 e digital g2.
- Frascos com formol tamponado a 10%

4.4 Irradiação

Os animais dos Grupos **2** foram irradiados na Clínica de Radioterapia “ Dr. Oswaldo Peres “ em São Paulo, com Telecobaltoterapia, sendo utilizada uma Unidade de Cobalto 60, Theratron 80*, da marca AECL.

O Grupo **2**, composto por 20 ratos, foi submetido, na sua totalidade, à dose de radiação de 1200 cGy , aplicação individual para cada rato e sob a forma de dose única.

Foram anestesiados 20 animais com solução de Xilazina a 2% e Cetamina 50mg/ml. As doses empregadas foram de 10 miligramas por quilo de peso corpóreo de Xilazina ; e 100 miligramas por quilo de peso corpóreo de Cetamina. O Anestésico foi aplicado intraperitoneal.

4.5 Campo de irradiação

Os ratos foram anestesiados conforme mencionado no item anterior, e colocados em decúbito dorsal sobre uma placa de acrílico de 25 centímetros de comprimento por 20 centímetros de largura, e fixados por meio de elásticos colocados nas patas dianteiras e traseiras e suavemente tracionados e ancorados em reparos existentes na referida placa.

Os animais foram irradiados separadamente, com campos de irradiação restritos a região de interesse, com as medidas de 8,0 centímetros de diâmetro longitudinal por 5,0 centímetros de diâmetro transversal.

Os campos de irradiação eram demarcados com uma caneta dermatográfica preta e régua. O ponto de referência para a marcação era a borda anal (referência caudal), traçando uma linha reta mediana em direção cranial até 8,0 centímetros. Após a referência longitudinal, traçava-se linha transversal, que cruzava a linha longitudinal no seu ponto médio, com tamanho de 5,0 centímetros distribuídos equitativamente para ambos os lados (Figura 1).

Figura 1 – Fotografia representando o campo de irradiação

O campo de irradiação, assim delimitado, garantia a exposição do segmento em estudo, compreendido entre a borda anal até a região do colo onde o linfonodo sentinela seria detectado.

Através de foco luminoso do aparelho de cobalto 60, o campo de interesse era definido. A distância axial do foco até a pele foi de 50 centímetros e a profundidade da pele até o órgão alvo foi de 1,5 centímetros.

Aplicavam-se blocos de chumbo que protegiam os demais segmentos do corpo do animal.

O rendimento médio do aparelho de Cobalto foi de 125 cGy (centigrays) por minuto, variando conforme a dose empregada. A pastilha

de Cobalto sofre desgaste com o tempo decorrido e redução do seu rendimento. Por este fato, a cada período de irradiação , ajustava-se o tempo de exposição à radiação, mediante a dose em questão.

O tempo de irradiação variou de 10 minutos e 31 segundos até 10 minutos e 45 segundos, de acordo com o mês da irradiação e o desgaste da pastilha.

4.6 Ensaio experimental da curva de calibração (eleição da dose de irradiação e tempo de ação actínica constatados por histologia)

Considerando a originalidade dessa pesquisa experimental, foi necessário o desenvolvimento de modelo experimental para determinar qual a melhor dose de irradiação, bem como o intervalo de tempo ideal entre a irradiação e o procedimento demarcatório, para a demonstração da mais objetiva ação actínica tecidual.

Esta nova amostra adicional, independente do objetivo principal desta tese, foi dividida por sorteio prévio em 2 grupos:

- Grupo **3** : Grupo irradiado com doses variáveis e com linfonodo marcado 2 dias após (n = 18)
- Grupo **4** : Grupo irradiado com doses variáveis e com linfonodo marcado 7 dias após (n = 16)

Os Grupos **3** e **4** foram utilizados para definição da dose de irradiação e o intervalo de tempo entre a irradiação e a marcação do

linfonodo sentinela.

O Grupo **3**, composto por 18 ratos , foi submetido a doses variadas de radiação, com a seguinte distribuição:

- 6 ratos com a dose de 2400 cGy
- 6 ratos com a dose de 1200 cGy
- 2 ratos com a dose de 900 cGy
- 2 ratos com a dose de 600 cGy
- 2 ratos com a dose de 300 cGy

Os ratos irradiados com 300, 600 e 900 cGy, total de 6 ratos, foram classificados como o subgrupo de doses baixas, haja vista que o comportamento destes ratos foi semelhante, no que se refere às variáveis estudadas. Os ratos irradiados com dose de 1200 cGy, total de 6 ratos, foram classificados como o subgrupo de dose intermediária. Os ratos irradiados com 2400 cGy, total de 6 ratos, foram classificados como o subgrupo de dose alta.

Todos os ratos do Grupo **3** foram mantidos nas mesmas condições das do Grupo **2** e submetidos à coloração linfática 2 dias após à exposição à radiação.

O Grupo **4**, composto por 16 ratos, foi dividido em 4 subgrupos de 4 animais cada, sendo que cada subgrupo foi submetido a doses de 300 cGy, 600 cGy, 900 cGy e 1200 cGy respectivamente. Os ratos submetidos a doses de 300, 600 e 900 cGy foram classificados como subgrupo de dose baixas. Os ratos submetidos à dose de 1200 cGy foram classificados como subgrupo de dose intermediária. Tentou-se ainda desenvolvimento

de um subgrupo de dose alta , submetendo 8 ratos à dose de irradiação de 2400 cGy. Entretanto, os ratos não suportaram a dose e o intervalo de tempo entre a irradiação e a demarcação do linfonodo sentinela (7 dias), evoluindo todos a óbito no quarto dia após a irradiação.

Todos os ratos do Grupo **4** foram mantidos nas mesmas condições dos demais grupos e submetidos ao procedimento de demarcação linfática, 7 dias após à exposição à radiação.

O tempo de irradiação variou de 2 minutos e 29 segundos até 22 minutos, de acordo com a dose de escolha, nos Grupos **3** e **4**.

A curva de calibração de irradiação e o intervalo de tempo para a ação actínica foram definidos através do estudo dos Grupos **3** e **4**, com a observação macroscópica dos órgãos, bem como sua análise histológica.

As doses de radiação utilizadas nos Grupos **3** e **4** foram administradas em uma única aplicação (dose única).

Todos os ratos dos Grupos **3** e **4** foram sacrificados ao final do procedimento de demarcação do linfonodo sentinela e retirada da peça cirúrgica em monobloco.

4.7 Demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato

Neste estudo adotou-se modelo experimental de demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato (MARGARIDO et al., 2004).

A marcação do linfonodo no Grupo **2** era realizada 2 dias após à exposição à radiação.

O corante utilizado foi o azul patente V (sal sódico do azul patente V) , com a seguinte composição : azul patente V (sal sódico) 50 miligramas, cloreto de sódio 12 miligramas, fosfato dissódico 12 H₂O (tampão) 1 miligrama e água para injetáveis q.s.p. 2 mililitros.

A concentração da solução é de 2,5 % e a apresentação é em ampolas de 2 mililitros. O corante Azul Patente é fabricado pela GUERBET*.

A dose de corante empregada foi de 0.1 mililitro. O corante foi aplicado sem diluição.

Todos os ratos do presente estudo foram submetidos à marcação do linfonodo sentinela.

Os 40 animais foram anestesiados conforme explicitado no item 4.4.

Uma vez anestesiado, o animal era fixado, em prancha cirúrgica acrílica, por meios de elásticos colocados nas patas dianteiras e traseiras.

A cauda do rato era levemente tracionada em direção caudal, o que expunha com bastante evidência o orifício anal do animal. Com auxílio de cotonete embebido em tintura de iodo-polivinil-pirrolidona (Povidine) , processava-se a limpeza e sanitização do canal anal e reto distal.

Com auxílio de pinça reta tipo Halsted, era pinçado pequeno segmento da porção mais dorsal da mucosa retal, a 1,0 centímetro da borda anal, e tracionado suavemente, também em sentido caudal. Esta manobra promovia a criação de pequena prega mucosa, a qual era facilmente puncionada sob visão direta, com seringa descartável BD ultra-

fine II.

Na Figura 2 está documentada a punção e aplicação do corante azul patente.

Figura 2 – Fotografia da punção da mucosa retal do rato

A infusão do corante era lenta e suave, para não propiciar extravasamento do corante, o que invalidaria a preparação.

Imediatamente após início da infusão, disparava-se um cronômetro pra aferir o intervalo de tempo entre a infusão do azul patente e a completa demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato.

A constatação da coloração do primeiro linfonodo era possível por meio de laparotomia mediana, realizada logo acima da sínfise púbica, numa extensão de 4 centímetros , em sentido cranial. A cavidade abdominal era preparada com a utilização de afastador estático para manter a cavidade exposta, colocação de gazes rechaçando as alças de

delgado , estômago e bexiga, mantendo campo operatório de interesse, que compreende o segmento do orifício anal até o aparecimento do linfonodo sentinela, distância esta de 6 centímetros.

Após a completa marcação do linfonodo sentinela, o cronômetro era interrompido e anotado o tempo de coloração do linfonodo.

Todos os ratos do presente estudo foram fotografados com máquina digital CANON G2, para comprovação do linfonodo corado.

Na Figura 3 está representada a demarcação do linfonodo.

Figura 3 – Linfonodo sentinela do reto do rato, demarcado com azul patente

Com auxílio de paquímetro metálico, era medida, em centímetros, a distância entre a linha pectínea e a porção mais caudal do linfonodo tingido. O ponto de aparecimento do linfonodo sentinela foi sempre o mesmo em todos os animais estudados.

A partir deste momento, procedia-se à retirada em monobloco da peça cirúrgica, composta pela pele perianal, contendo orifício anal, todo o

reto e sigmóide, com os respectivos mesos, incluindo o linfonodo demarcado (Figura 4). Todo o material era colocado em frasco contendo formol tamponado, com a identificação do material e, em seguida, encaminhado para estudo histológico.

Todos os animais do presente estudo foram sacrificados logo após a retirada da peça cirúrgica.

Figura 4 – Fotografia da peça cirúrgica-monobloco

4.8 Preparo das lâminas

A primeira etapa foi a macroscópica. A peça cirúrgica em monobloco foi cortada com navalha descartável, retirando-se amostras de

0,5 centímetro, dos segmentos relacionados abaixo :

- Segmento distal do reto a 0,5 centímetro acima da margem anal
- Segmento médio do reto, à meia distância entre os segmentos distal e proximal
- Segmento proximal do reto , correspondente ao local adjacente ao linfonodo sentinela

O linfonodo sentinela foi seccionado no sentido transversal, preservando o meso ao seu redor.

Os espécimes foram incluídos em parafina pela técnica rotineira e posteriormente cortados com micrótomo .

O material foi desparafinado com Xilol a uma temperatura de 60 ° C, hidratado através de banho em etanol graduados decrescentes e, em seguida, lavado em água corrente.

A lâmina preparada era colocada em solução alcoólica Hematoxilina de Harris por 5 minutos e depois lavado com água corrente. A seguir, era embebida em solução Eosina-floxina por 1 minuto (BEHMER et al.,1976).

Foi realizado, também, a coloração com Tricômico de Masson (BEHMER et al., 1976).

4.9 Avaliação histológica

A análise histológica das lâminas do presente estudo foi efetuada no Laboratório Classe I , pelo patologista Dr. Valcir Chiferi Junior.

A avaliação histopatológica dos linfonodos e da parede intestinal foi realizada através da análise das lâminas coradas pela Hematoxilina – Eosina e pelo Tricrômico de Masson, em Microscópio Óptico, com aumento 40 vezes e 100 vezes. Tanto os animais do grupo controle, como os irradiados tiveram a mesma análise histológica.

A metodologia utilizada para avaliação foi a leitura global de todo o espécime representado na lâmina.

Foram analisados separadamente cortes histológicos do linfonodo sentinela do reto dos ratos e da mucosa retal dos ratos.

Os linfonodos foram divididos e classificados de acordo com seus achados da seguinte forma:

- a) linfonodo normal: aquele que apresentava arquitetura habitual preservada, ou seja folículos linfóides dispostos lado a lado e seios marginais com células histiocitárias. Os folículos eram constituídos por coroa linfocitária abundante, sem espaço visível entre as células.
- b) linfonodo depletado: mostrou uma alteração parcial da arquitetura às custas da diminuição importante do número de linfócitos maduros dos folículos e substituição dos mesmos por histiócitos e células epitelióides. A diminuição excessiva de linfócitos demonstrou o aspecto em “céu estrelado”, característico das depleções linfocitárias agudas e graves, que no nosso caso foram causadas pela radiação. Como cada organismo apresenta resposta variável para o mesmo estímulo, fizemos uma análise qualitativa nas amostras enviadas.

No linfonodo, os achados foram graduados de forma qualitativa para o parâmetro depleção linfocitária, classificando-o como ausente (0) quando não havia alteração estrutural do linfonodo ; e presente (1) quando não havia folículos linfóides de forma global ou parcial.

Na parede intestinal, foram realizados cortes nas porções proximal, média e distal. Os achados foram graduados de forma semi-quantitativa para o parâmetro atrofia de mucosa, classificando-os como ausentes (0) quando não havia sinais de atrofia ; leves (1) quando a atrofia estava presente em 1 das 3 porções ; moderados (2) quando a atrofia foi detectada em 2 das 3 porções ; e intensos (3) quando as 3 porções apresentavam atrofia. Considerou-se a atrofia como presente, tanto na forma ulcerada como na forma pura (relação criptas/vilos diminuída) com preservação da mucosa.

As alterações intestinais decorrentes de ação actínica e consideradas como importantes para a análise semi-quantitativa foram:

- a) úlcera ou erosão da mucosa
- b) atrofia da mucosa
- c) edema de parede
- d) endoteliose vascular
- e) fibrose actínica
- f) neoformação vascular com congestão e hemorragia.

A avaliação histológica das lâminas foi fundamental para a escolha da dose de radiação eficaz para produzir alterações teciduais e efeitos actínicos suficientes para comprovar sua atuação e efetividade.

4.10 Variáveis escolhidas

O presente estudo utilizou as seguintes variáveis para efeito de comparação dos Grupos **1** e **2** :

- Tempo de coloração do linfonodo sentinela
- Presença ou não do linfonodo sentinela corado
- Atrofia da mucosa da parede do reto (proximal, médio e distal)
- Depleção linfocitária no linfonodo sentinela

As variáveis escolhidas serviram como referência para a dose de radiação ionizante utilizada, bem como para avaliar se a radiação influenciava a coloração do linfonodo sentinela do reto.

4.11 Análise estatística

Os dados deste trabalho foram analisados mediante um nível de significância estabelecido de 5 % ($\alpha = 0,05$) , de acordo com o padrão geral comum na área médica e biológica. Desta forma, os valores calculados da probabilidade de erro (**P**) quando $\leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes (*) e quando $> 0,05$ foram tomados como não significantes (NS). (DIXON e MASSEY, 1969; DAWSON ; TRAPPS, 1994; ROSNER, 1995). DAWSON; TRAPPS, 2003)

Considerando-se o número de casos e a natureza das variáveis, algumas delas de quantificação subjetiva, optou-se predominantemente

pela utilização dos métodos estatísticos não paramétricos (ARMITAGE e BERRY, 1994; GLANTZ, 1996).

Os dados obtidos referentes à atrofia da mucosa retal e da depleção linfocitária, variáveis de quantificação subjetiva, foram confrontados estatisticamente empregando-se métodos não paramétricos.

Sempre que a análise estatística permitiu concluir pela existência de diferença estatisticamente significativa, o valor correspondente ao teste empregado foi anotado e destacado pela impressão em negrito e por um asterisco (*).

Os modelos estatísticos escolhidos são relacionados a seguir :

- 1 – Média aritmética, valor mínimo e valor máximo.
- 2 – Cálculo de percentuais.
- 3 – Prova não paramétrica U de Mann-Whitney
- 4 – Tabela de contingência 2 x 2.
- 5- Teste exato de Fisher.
- 6 – Correlação não paramétrica, por postos, de Spearman
- 7 – Elaboração de curva logarítmica.
- 8 – Elaboração de curva de função quadrática.
- 9 – Gráficos em barra vertical.

Os programas estatísticos mais utilizados foram : Microsoft Excel 1997 : Statistica for Windows (StatSoft Inc.) release 5.0 A, 1995 ; Minitab (Minitab Inc.) release 13.1, 2000 ; SPSS for Windows (SPSS Inc.) release 10.0.1, 1999 ; NCSS release 2000.

5 – RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em Quadros, Tabelas e Gráficos. Os achados histológicos são apresentados sob a forma de Fotomicrografias e descritivos dos achados das lâminas.

Os dados individuais de todas as variáveis avaliadas estão dispostos em tabelas no Capítulo de Anexos.

5.1 Resultados principais

O estudo estatístico apresentou os seguintes resultados :

1) - Análise do tempo de coloração do linfonodo (intervalo de tempo entre o início da injeção do contraste até a completa coloração do linfonodo) em função do período da irradiação até a marcação do linfonodo. Comparação entre os Grupos 1 (controle = tempo zero) e 2 (irradiado com 1200cGy = 2 dias).

A média aritmética do tempo do grupo 1 foi de 5,90 e a do grupo 2 de 7,60 minutos, como demonstrado na Tabela 1.

TABELA 1 : MÉDIA DO TEMPO DE COLORAÇÃO X INTERVALO DE TEMPO ENTRE IRRADIAÇÃO E A DEMARCAÇÃO DO LINFONODO

GRUPOS	TEMPO MÉDIA	nº RATOS
1	5,90	20
2	7,60	20

**GRÁFICO 1 : TEMPO DE COLORAÇÃO X TEMPO ENTRE IRRADIAÇÃO E
DEMARCAÇÃO DO LINFONODO**

TEMPO DE COLORAÇÃO

Barras verticais representativas das médias aritméticas do tempo de coloração dos Grupos 1 e 2 . Grupo 1 , não irradiado (0 cGy) e Grupo 2, irradiado (1200 cGy).

Observa-se neste gráfico ,que o tempo de coloração do Grupo 2 (1200 cGy ; 2 dias) apresenta um aumento de 28,81 % em relação ao Grupo 1 , embora, esta diferença, quando analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, não chegou a atingir valor estatisticamente significativo, onde $z = 0,66$ e $P = 0,507510$ NS.

2) – Análise da depleção linfocitária em função do intervalo de tempo entre a irradiação e a marcação do linfonodo.

TABELA 2 : DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA MÉDIA X INTERVALO DE TEMPO EM DIAS. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS 1 E 2.

GRUPOS	DEPLEÇÃO MÉDIA	nº RATOS
1	0,20	20
2	0,75	20

Observa-se que a depleção média do Grupo **2** é 3,75 vezes maior que a do Grupo **1**. Quando realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney , a diferença entre os Grupos **1** e **2** mostrou variação significativa onde $z = 2,98$ e $P = 0,002927^*$.

GRÁFICO 2 : DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA MÉDIA x INTERVALO DE TEMPO EM DIAS. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS 1 E 2.

Barras verticais representativas da proporção média da depleção linfocitária do Grupo 1 (0 cGy) e do Grupo 2 (1200 cGy).

Ao analisarmos a proporção da depleção linfocitária nos grupos **1** e **2**, observa-se diferença expressiva entre as barras, evidenciando uma rápida ascensão do Grupo **2** em relação ao Grupo **1**.

Considerando que a depleção linfocitária é uma variável binária ou dicotomizada, ou seja, com duas possibilidades de resultado, sim (1) e não (0), podemos então construir uma Tabela de Contingência 2×2 , para verificar a diferença de proporção entre os Grupos **1** e **2** e aplicar o teste exato de Fisher, mais adequado no caso, pois no total de 40 ratos, existe uma casa com valor menor que 5.

A Tabela 2×2 é mostrada a seguir:

TABELA 3 : TABELA DE CONTINGÊNCIA 2×2 : DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA MÉDIA. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS 1 E 2.

GRUPOS			
DEPLEÇÃO	1	2	TOTAL
SIM (1)	4 (20%)	15 (75%)	19
NÃO (0)	16 (80%)	5 (25%)	21
TOTAL	20	20	40

Verificamos na linha do **sim** proporção de 20 % de depleção para o Grupo 1 e proporção de 75 % de depleção para o Grupo 2 .

Esta diferença de proporções, analisada pelo teste exato de Fisher, revelou resultado estatisticamente significativo, onde **P = 0,00123 *** .

3) - Análise da atrofia da mucosa do reto em função do intervalo de tempo entre irradiação e marcação do linfonodo entre os Grupos 1 e 2.

GRÁFICO 3 : ATROFIA DA MUCOSA MÉDIA x INTERVALO DE TEMPO EM DIAS

Observa-se neste gráfico , que o Grupo 1 apresentou média de atrofia = 0,60, enquanto que o Grupo 2 demonstrou aumento da média de atrofia em 1,42 vezes em relação ao Grupo 1. Quando realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney , a diferença entre os Grupos 1 e 2 não mostrou variação estatisticamente significativa , onde $z = 2,98$ e $P = 0,372050$ NS .

TABELA 4 : ATROFIA MÉDIA x INTERVALO DE TEMPO EM DIAS
COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS 1 E 2.

GRUPOS	ATROFIA MÉDIA	nº RATOS
1	0,60	20
2	0,85	20

4) – Avaliação da atrofia da mucosa do reto em função do tempo de coloração (do início da injeção do corante até a demarcação final) em minutos, nos Grupos 1 e 2 .

GRÁFICO 4 : QUANTIFICAÇÃO DA ATROFIA (0, 1, 2, 3) X TEMPO DE COLORAÇÃO EM MINUTOS

Curva logarítmica construída com as quantificações médias da atrofia da mucosa do reto em função do tempo de coloração em minutos.

Observa-se um aumento progressivo da quantificação média da atrofia com o aumento do tempo de coloração completa do linfonodo sentinela.

A correlação não paramétrica, por postos, de Spearman, entre estas duas variáveis, revelou uma relação significativa e diretamente proporcional, com $R = 0,2929$ e $P = 0,014602^*$.

TABELA 5: QUANTIFICAÇÃO MÉDIA DA ATROFIA x TEMPO DE COLORAÇÃO EM MINUTOS

ATROFIA	MÉDIA DO TEMPO DE COLORAÇÃO	nº RATOS
0	5,60	17
1	6,74	18
2	9,50	4
3	10,00	1

Valores médios do tempo de coloração, em minutos, para cada uma das quantificações da atrofia.

5) – Avaliação do número de linfonodos corados em função do intervalo de tempo entre irradiação e marcação dos linfonodos , nos Grupos 1 e 2.

GRÁFICO 5 : NÚMERO DE LINFONODOS CORADOS (MÉDIA) x INTERVALO DE TEMPO EM DIAS

Observa-se neste gráfico , que o Grupo 1 apresentou média de linfonodos corados = 1,20, enquanto que o Grupo 2 demonstrou redução da média de linfonodos corados em 20 % em relação ao Grupo 1. Quando realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney , a diferença entre os Grupos 1 e 2 não mostrou variação estatisticamente significante, onde $z = 1,08$ e $P = 0,279259$ NS .

TABELA 6 : NÚMERO DE LINFONODOS CORADOS (MÉDIA) x INTERVALO DE TEMPO EM DIAS. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS 1 E 2.

GRUPOS	LINFONODOS CORADOS	nº RATOS
1	1,20	20
2	1,00	20

5.2 Resultados associados (em função das doses de radiação e tempo de demarcação-curva de calibração)

1) – Avaliação da depleção linfocitária em função das doses de radiação utilizadas em todo o estudo

GRÁFICO 6 : DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA MÉDIA X DOSES DE RADIAÇÃO

Gráfico 6 : Curva de função quadrática construída com os valores médios da depleção linfocitária em relação aos valores médios das doses de radiação (cGy).

A observação do Gráfico 6 demonstrou que a curva apresentou crescimento mais acentuado até a dose de 1200cGy, aproximadamente 4 vezes, ou seja, houve aumento mais acentuado e progressivo da depleção linfocitária com o aumento das doses de radiação, atingindo valor expressivo em 1200cGy. A partir da dose de 1200cGy, observou-se uma

tendência a estabilização da curva e crescimento menor até a utilização da dose de 2400cGy (apenas 26,58 %).

A correlação não paramétrica, por postos, de Spearman, entre os valores da depleção linfocitária e as doses de radiação, foi altamente significativa, com $R = 0,5674$ e $P = 0,000001^*$.

TABELA 7 : DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA MÉDIA X DOSES DE RADIAÇÃO
(300, 600, 1200 e 2400CgY).

DOSES	DEPLEÇÃO MÉDIA
0	0,20
300	0,33
600	0,67
1200	0,79
2400	1,00

A Tabela 7 demonstra que houve aumento progressivo da depleção linfocitária, diretamente proporcional ao aumento das doses de radiação.

5.3 Resultados histológicos principais

A análise histológica evidenciou os seguintes achados :

- segmentos proximal , médio e distal do reto do Grupo **1** (controle):
espessura normal da mucosa, com vilosidades e criptas conservadas, sem evidências de atrofia ou ulceração (Figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografia da mucosa normal do reto do rato (Masson - 100x)

- segmentos proximal, médio e distal do reto do Grupo **2** : atrofia da mucosa, com relação vilo-cripta diminuída , presença de edema, ulcerações (Figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografia da mucosa do reto do rato - 1200 cGy – 2 dias de irradiação (Masson - 100x)

Figura 7 – Fotomicrografia da mucosa do reto do rato - 1200 cGy – 2 dias de irradiação (HE - 100x)

- linfonodo do Grupo 1 (controle) : constituído por folículos linfóides exuberantes, com arquitetura preservada, sem evidências de depleção linfocitária (Figura 8).

Figura 8 – Fotomicrografia do linfonodo normal do reto do rato (HE - 100x)

- linfonodo do Grupo 2: evidente alteração da arquitetura, com depleção linfocitária intensa e ausência de folículos linfóides (Figura 9).

Figura 9 – Fotomicrografia do linfonodo do reto do rato - 1200 cGy – 2 dias de irradiação (HE - 100x)

5.4 Resultados histológicos associados (curva de calibração)

- segmentos proximal, médio e distal do Grupo **3** : espessura da mucosa diminuiu progressivamente à medida que a dose aumentou; com a dose de 2400cGy, a mucosa apresentou atrofia e áreas de ulceração (Figura 10), à semelhança do aspecto do Grupo **2** (Figura 7).

Figura 10 – Fotomicrografia da mucosa do reto do rato - 2400 cGy – 2 dias de irradiação (Masson - 100x)

- segmentos proximal, médio e distal do reto do Grupo **4** : parede intestinal com áreas de atrofia focal e diferentes estágios de regeneração da mucosa (Figuras 11 e 12).

**Figura 11 – Fotomicrografia da mucosa do reto do rato – 1200 cGy – 7 dias
(Masson - 40x)**

**Figura 12 – Fotomicrografia da mucosa do reto do rato – 1200 cGy – 7 dias
(Masson - 100x)**

- linfonodo do Grupo **3** : presença de mínima alteração estrutural, caracterizada pela diminuição de linfócitos em áreas focais (com dose de 300cGy) e acentuação da alteração da arquitetura com o aumento da dose; ausência de agregados linfóides com a dose de 2400cGy.

Figura 13 – Fotomicrografia do linfonodo do reto do rato - 300cGy – 2dias de irradiação (HE – 100x)

Figura 14 – Fotomicrografia do linfonodo do reto do rato - 2400cGy – 2dias de irradiação (HE – 100x)

- linfonodo do Grupo **4** : alteração parcial devido à depleção linfocitária focal, mas já com áreas de repopulação celular e áreas de formação de folículos linfóides.

Figura 15 – Fotomicrografia do linfonodo do reto do rato - 1200cGy – 7 dias de irradiação (HE – 100x)

Os linfonodos eram considerados depletados quando não havia folículos linfóides de forma global ou parcial. O aspecto histológico da depleção linfocitária mostra espaços entre os linfócitos, caracterizando o aspecto em “céu estrelado” (Figuras 9 e 14).

6 – DISCUSSÃO

Após revisão sistemática da Literatura Médica, constatamos escassez de trabalhos científicos, principalmente experimentais, relacionados ao estudo do linfonodo sentinela do reto e seu comportamento frente à radiação ionizante locorregional (PLESKOVIC et al, 2001 ; PINHEIRO et al., 2003).

O animal de escolha foi o rato Wistar com peso aproximado de 305 gramas que caracteriza a idade adulta dessa espécie. Essa espécie animal é de fácil obtenção junto ao Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os ratos Wistar são de fácil manipulação e resistentes a infecções e ao trauma cirúrgico. A opção pelo uso de machos foi intencional e significativa, pois conseguimos excluir da amostra, ratas que eventualmente estivessem prenhas, o que implicaria em influências hormonais não controláveis. Com isso, garantimos melhor homogeneidade da amostra.

O modelo adotado foi desenvolvido no próprio Laboratório de Investigação Médica (LIM -26) da Disciplina de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da FMUSP (Serviço do Prof. Dr. Erasmo Magalhães Castro de Tolosa) (MARGARIDO et al, 2004) sendo que este modelo experimental foi objeto de prêmio. O modelo mostrou-se ser de fácil realização , reprodutível, confiável e de baixo custo

operacional. Isso permite que a sua utilização seja facilitada. A partir desse modelo, criou-se linha de pesquisa com possíveis vertentes para novos estudos.

Os parâmetros desse modelo experimental baseiam-se na completa coloração do linfonodo sentinela do reto, ou seja, no intervalo de tempo do início da infusão do corante e a completa demarcação do linfonodo.

De acordo com URBAN e colaboradores (2001), o uso do corante vital na detecção do linfonodo sentinela no câncer de mama começou no *John Wayne Cancer Institute*.

GIULIANO e colaboradores (1994) tiveram um índice de 65 % de sucesso na detecção do linfonodo sentinela em pacientes com câncer de mama, em seus primeiros casos, utilizando o *isossulfan blue* isoladamente. Posteriormente, houve aumento nesse índice de sucesso para 93 %, que foi relacionado a uma maior experiência com a técnica. A sensibilidade e a especificidade foram comparadas com o esvaziamento axilar, que foi realizado em todos os casos iniciais, independente do comprometimento do linfonodo sentinela. A sua acurácia em relação à axila foi de 100%. A grande crítica à aplicação do corante vital isolado é justamente que necessita de treinamento inicial com número mínimo de casos, para que se adquira certo grau de experiência (habitualmente 30 casos) e se atinja maior confiabilidade no método (URBAN et al., 2001). Segundo GIULIANO e colaboradores (1994), a curva de aprendizado com técnica do corante vital isolado é de 35 casos.

No caso do modelo experimental utilizado nesta pesquisa, pela sua extrema facilidade de realização, fácil acesso à mucosa anal , ao reto e respectivo meso, encurta em muito a curva de aprendizado deste modelo. Com segurança, a técnica é reprodutível com o máximo de 5 eventos experimentais, garantindo a confiabilidade do modelo (MARGARIDO et al., 2004).

O corante vital apresenta poucos efeitos colaterais, sendo relatadas reações alérgicas leves em menos de 1,5 % dos casos. O azul patente, o mais usado em nosso meio, é um trifenil metano similar em estrutura ao *isossulfan blue* , mas com uma concentração maior (2,5 % em solução aquosa comparada com 1 % da concentração do *isossulfan blue*). Ambos apresentam bons resultados, mas , como sugerido por MORTON e colaboradores (1992) em sua descrição original com o melanoma, o azul patente produz melhor visualização dos linfáticos. Também apresenta baixa incidência de reações de hipersensibilidade , incluindo urticária, edema angioneurótico, laringoespasma e colapso vasomotor. A pele revela coloração azulada em poucos minutos, permanecendo dessa forma por 24 a 48 horas. A urina torna-se azulada durante cerca de dois dias. Não existem efeitos a longo prazo e nem efeitos teratogênicos associados (URBAN et al., 2001).

Como na presente pesquisa, todos os animais foram sacrificados após a completa demarcação do linfonodo sentinela do reto do rato, não dispomos desses dados, o que implicará em futuras pesquisas.

A identificação dos linfonodos sentinelas pode ser obtida, também, através da utilização de radioisótopos e contadores de radiação, como o contador Geiger (PIATO et al., 2002 ; PINHEIRO et al., 2003).

MARIANI e colaboradores (2002) demonstraram a importância da realização de procedimento minimamente invasivo, como a biópsia do linfonodo sentinela de melanoma maligno cutâneo, guiada por linfocintilografia, utilizando-se colóide marcado com tecnécio.

Como o presente estudo foi realizado tendo como base campo de irradiação pequeno, e pela dificuldade de disponibilidade do referido contador, a opção foi o uso exclusivo do corante azul patente, comprovadamente eficaz para a demarcação do linfonodo sentinela.

Ao modelo de demarcação do linfonodo sentinela de reto de rato com azul patente, foi associada à proposta de radiação ionizante prévia (pré-operatória), visando à contribuição do estudo concomitante dessas variáveis.

Na prática médica, usa-se a irradiação pré-operatória como tratamento adjuvante significativo, para redução da massa tumoral e recidas locais pelo manuseio cirúrgico (NADALIN et al., 1999 ; NIVATVONGS et al., 1999 ; ADELL et al., 2001).

A experiência clínica mostra que a utilização de Cobalto 60 é um dos métodos mais empregados na complementação do tratamento de diferentes tipos de câncer (KHAN, POTISH, 1998). A partir desse

conhecimento e , em especial, pela possibilidade de utilização em caráter experimental, esta modalidade de irradiação foi eleita para a presente pesquisa.

O Cobalto 60 apresenta como características a capacidade de atuar sobre campos de irradiação de pequenas dimensões e de profundidade reduzida (PEREZ, BRADY, 1998), o que compatibiliza com o modelo adotado. A distância axial do foco do aparelho de Cobalto 60 e a profundidade da pele até o órgão alvo determinou e reforçou esta escolha (PEREZ, GLASGOW, 1992). Outras modalidades de irradiação utilizam formas de radiação com maior profundidade de penetração nos tecidos e promoveriam modificações não objetivadas nesta pesquisa.

O presente trabalho trata-se de uma preparação aguda, o que possibilita coleta imediata de resultados com mínima perda de espécimes.

Dependendo da dose e do tempo de irradiação, podem ser observadas lesões , identificadas pela histologia, de características agudas (imediatas), lesões crônicas e lesões tardias. As lesões agudas, provocadas pela radiação ionizante, são as de interesse no presente estudo (PEREIRA, 2000).

Na fase aguda, a análise histológica revela : lesões degenerativas, que vão desde degeneração hidrópica até necrose. Se são células com grande atividade mitótica, há inibição da proliferação e aparecimento de mitoses atípicas. Além disso, são freqüentes, células com núcleos

pleomórficos decorrentes de aneuploidia e poliploidia. Células gigantes, com núcleos bizarros, são também comuns. Tais aberrações nucleares podem trazer dificuldades ao patologista que examina tecidos após irradiação, para verificar a possível persistência de células cancerosas, que também possuem núcleos pleomórficos e aberrantes; alterações vasculares, muito freqüentes. Há vasodilatação de células endoteliais, que podem sofrer necrose. Além do aumento da permeabilidade vascular (edema), pode haver ruptura da parede, hemorragia, formação de trombos e lesões decorrentes da obstrução do vaso (PEREIRA, 2000).

As lesões produzidas pelas radiações ionizantes dependem de vários fatores, entre os quais: dose e tempo de exposição, sendo que doses repetidas são mais lesivas do que a mesma dose aplicada de uma só vez; oxigenação dos tecidos, pois quanto maior a disponibilidade de oxigênio, maior a radiosensibilidade; substâncias radiosensibilizantes, como análogos das bases orgânicas pirimídicas, aumentam o poder lesivo das radiações; os elementos que removem radicais livres, como a cisteína e a cistiamina, exercem efeitos radioprotetores e, em diferentes fases do ciclo celular tornam as células mais ou menos radiosensíveis: célula em G2 ou em M (mitose) são mais sensíveis do que as em G1, enquanto que a menor sensibilidade é vista nas células no final da fase S (PEREIRA, 2000).

Os tecidos com maior atividade mitótica são geralmente os mais radiosensíveis e os primeiros a apresentarem alterações após radiações.

Os linfonodos e sistema linfóide são exemplos de tecidos de elevada radiosensibilidade, enquanto que o epitélio gastrointestinal representa um tipo de tecido de alta radiosensibilidade (PEREIRA, 2000). Por este motivo, foi utilizado, no presente estudo, a avaliação da mucosa da parede do reto e do linfonodo sentinela, para análise dos efeitos da radiação ionizante e a escolha da dose de radiação, capaz de promover alterações actínicas significativas nos segmentos estudados.

MIURA (2002) estudou a relação entre a atividade apoptótica e a radiosensibilidade ou resposta tumoral à radioterapia e quimioterapia. A apoptose parece ser um fator preditivo à resposta à radioterapia e quimioterapia. Defeitos na apoptose podem ser responsáveis pela resistência à radioterapia e quimioterapia (REED, 2004).

COSTA; FAGUNDES (2002); GOYTISOLO e colaboradores (2000) realizaram estudos experimentais para avaliação dos efeitos da radiação ionizante e a radiosensibilidade dos tecidos à ação da irradiação.

MARKS e MOHIUDDEN (1983) observaram que a radioterapia diminuiu a atividade nas criptas, interrompendo o suprimento de células às vilosidades e diminuindo a sua espessura e a superfície absorptiva da mucosa.

SCOTT e MOELLMAN (1992) observaram lesão da parede intestinal, após irradiação abdominal, com a utilização de radiação ionizante na dose única de 1000cGy, não ocorrendo morte dos ratos devido à irradiação.

KLIMBERG e colaboradores (1990) já haviam utilizado a mesma dose de radiação (1000cGy) para provocar lesão actínica na parede intestinal.

Segundo HWANG e colaboradores (2003), a dose de radiação, utilizada para obtenção de lesão da parede intestinal, foi de 1100cGy, dose única, com efeitos satisfatórios e sem mortalidade.

DIESTEL e colaboradores (2005) utilizaram dose única de radiação de 1100cGy, na região abdominal, para produzir translocação bacteriana e destruição da parede do intestino. Com esta dose, observaram morte dos ratos após irradiação. Reduziram, então, a dose de radiação para 1000cGy, dose única, e não houve mortalidade dos ratos, dose esta adotada no trabalho destes autores.

Frente à escassez de referências bibliográficas que explicassem a metodologia para a escolha da dose de radiação, e a dificuldade de estabelecer consenso quanto à orientação da dose de radiação e o tempo de estudo da interação biológica desse procedimento, estes fatos motivaram à criação da curva de calibração das doses de radiação (Grupos **3** e **4**).

Com relação à dose de radiação utilizada no Grupo **2**, a escolha foi embasada na análise histológica das lâminas dos Grupos **3** e **4**. As doses mais baixas, 300cGy, 600cGy e 900cGy, apresentaram repercussão menos intensa, no tocante à depleção linfocitária e atrofia da mucosa do

reto. Estes parâmetros eram mais intensos na dose de 1200cGy, que , por sua vez , manifestavam-se de forma muito semelhante à dose de 2400cGy. Foi, então, optado pela dose de 1200cGy para a utilização no Grupo **2**, comparado ao Grupo **1** (Controle).

Quanto à escolha para padronização do intervalo de tempo entre a irradiação e a marcação do linfonodo , ou seja, 2 dias ou 7 dias, a análise histológica do Grupo **4** evidenciou aspectos estruturais do linfonodo muito aproximados aos do Grupo **1**, sugerindo que o intervalo de 7 dias entre a irradiação e a marcação do linfonodo foi suficiente para a repopulação das células do linfonodo e da parede do reto. Este fato induziu à opção pelo intervalo de 2 dias, comprovado pela avaliação histológica dos segmentos estudados, antes de ocorrer a recuperação celular , haja vista que o período de apoptose induzido pela radiação era de 48 horas.

Foi, então, optado pela dose de 1200cGy para a utilização na pesquisa, e o intervalo de tempo de interação tecidual de 2 dias , constituindo-se o Grupo **2** para ser comparado com o Grupo controle, que foi objetivo principal desta pesquisa.

PEREIRA e colaboradores (2004) apresentaram modelo de lesão actínica de intestino grosso de ratas, submetendo os animais a 8 sessões de 5 cGy, atingindo dose total de 60 cGy na superfície do animal e de 54 cGy no fragmentado do colon estudado. Este modelo procurou estabelecer paralelo entre a dose empregada de radiação e a distância do órgão-alvo. As manifestações da enterite começaram após a terceira ou quarta

aplicação da radioterapia e cessaram quatro dias após a última aplicação. Segundo PEREIRA e colaboradores (2004) há uma estimativa de 5 % de risco de desenvolvimento de complicações em cinco anos com dose total entre 60 a 65cGy.

DIESTEL e colaboradores (2005) utilizaram ratos machos adultos Wistar , submetidos a dose única de radiação de 1000cGy no oitavo dia da experimentação. A dose de 1000cGy foi calculada para a aplicação a 3,0 centímetros da pele (normalização da dose) e liberada no sentido caudal, sendo capaz de produzir destruição considerável na parede colônica.

O presente estudo utilizou 1200cGy, dose única, como modelo de lesão actínica. A escolha da dose foi embasada no modelo experimental desenvolvido de curva de calibração, com a análise do comportamento de diferentes doses de radiação em função das variáveis escolhidas e das avaliações histológicas, comprovando definitivamente a ação deletéria da radiação ionizante sobre a parede do colon irradiado e o linfonodo sentinela.

PLESKOVIC e colaboradores (2001) realizaram estudo experimental com cães, e avaliaram alterações histológicas e estruturais nos enterócitos, linfócitos, células secretoras de serotonina e somatostatina e mastócitos , da mucosa do colon, um dia após o término da radioterapia e quimioterapia combinadas. Os resultados do experimento mostraram que ocorria perda de enterócitos e linfócitos imediatamente após o término da terapia. Observava-se , também, aumento do volume e da densidade das

células secretoras de serotonina e somatostatina. Estas alterações morfológicas na mucosa do colon provavelmente seriam as primeiras , acarretando lesão da barreira mucosa, síndrome de mal-absorção, estenose, processos inflamatórios e outras complicações decorrentes da radioterapia e quimioterapia.

Com relação aos resultados obtidos no presente estudo, observam-se os seguintes aspectos :

1 – Aumento no tempo de coloração do linfonodo do Grupo **2** em relação ao Grupo **1**, porém sem significância estatística. Entretanto, nota-se aumento no tempo de coloração do linfonodo do Grupo **4** em relação aos Grupos **1** e **2**. Portanto, o linfonodo sentinela precisa de mais tempo para sua completa demarcação nos ratos irradiados e marcados após 7 dias da irradiação.

2 – A dose de 2400cGy provoca depleção linfocitária, porém acarreta grande lesão, sem grande vantagem, ou seja, não há aumento progressivo da depleção. A depleção linfocitária ocorre de forma progressiva em relação ao aumento das doses de radiação, principalmente na dose de 1200cGy. As alterações dos lindonodos, sob efeito da radiação ionizante, são muito semelhantes , do ponto de vista histológico, com as doses de 1200 cGy e 2400 cGy, não havendo vantagens para a utilização da dose de 2400 cGy.

3 – A depleção linfocitária atinge resultado expressivo no intervalo de

tempo de 2 (dois) dias, compreendidos entre a irradiação e a marcação do linfonodo, o que sugere que a dose de 1200cGy é uma dose eficiente para provocar efeitos actínicos no linfonodo. Quando avaliamos a depleção linfocitária sob o ponto de vista histológico, nota-se que o linfonodo marcado 2 dias após irradiação, apresenta intensa depleção linfocitária, ao passo que, a análise do linfonodo marcado 7 dias após irradiação, manifesta-se com áreas de depleção linfocitária entremeadas por áreas de repopulação celular com formação de folículos linfóides regenerados. O tempo de 7 dias foi suficiente para que o linfonodo iniciasse sua recuperação, entretanto, o período de 2 dias revelou alterações actínicas, causando importante depleção no linfonodo sentinela, haja vista que o período de 48 horas é o tempo conhecido de apoptose no linfonodo, induzida pela radiação ionizante.

4 – Há correlação entre a quantificação da atrofia e o tempo de marcação (coloração) do linfonodo sentinela. Observa-se aumento do tempo de coloração do linfonodo à medida que a atrofia da mucosa manifesta-se de forma mais intensa. Há uma tendência à estabilidade da resposta do tempo médio de coloração em função do aumento da intensidade da atrofia, com a ocorrência de pequenas variações na atrofia com graduação 3 (presença de atrofia nos segmentos distal, médio e proximal do reto).

5 – Como parte da curva de calibração (Grupo 4), 8 ratos foram submetidos à dose de radiação de 2400 cGy, com programação de

marcação do linfonodo sentinela 7 dias após irradiação. Entretanto, estes animais não resistiram à lesão causada pela radiação e foram a óbito 4 dias após irradiação. Inferimos que a dose de 2400 cGy e o intervalo de 7 dias após irradiação foi letal para os ratos, corroborando a hipótese de que esta dose não deve ser utilizada, haja vista que provocou efeitos não desejados, deletérios aos animais.

6 – Em todos os ratos do presente estudo, foi possível a realização da marcação do linfonodo sentinela do reto, o que demonstra que a radiação ionizante não foi capaz de bloquear o mapeamento do linfonodo sentinela do reto do rato.

Perspectivas

A partir da caracterização desse modelo experimental, tem-se condições de ampliar esta linha de pesquisa, com inúmeros aspectos alternativos, que poderão ser investigados e constituir-se em importantes subsídios, para orientação da terapêutica das neoplasias .

Assim, em futuro próximo, poder-se-á desenvolver modelo experimental de indução de carcinossarcoma de Walker 256 em ratos, e comparar a demarcação de linfonodo sentinela, com radiação ionizante, ressecção cirúrgica da neoplasia e recidivas locais, entre outras alternativas.

7 – CONCLUSÃO

Nas condições da presente pesquisa, podemos concluir :

- 1) – A radiação ionizante prévia não influenciou o resultado final da marcação do linfonodo sentinela do reto do rato.

8 – ANEXOS

GRUPO 1 - CONTROLE						
<i>Nº RATO</i>	<i>PESO</i>	<i>DOSE</i>	<i>TEMPO DE COLORAÇÃO</i>	<i>Nº GÂNGLIOS CORADOS</i>	<i>ATROFIA DA MUCOSA</i>	<i>DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA</i>
1	405	0	6	1	0	0
2	265	0	5	1	0	0
3	296	0	7	1	0	0
4	256	0	6	1	0	0
5	424	0	6	1	0	0
6	408	0	8	1	1	0
7	367	0	5	1	0	0
8	369	0	5	1	1	0
9	278	0	6	1	0	1
10	269	0	5	1	2	0
11	265	0	6	2	1	0
12	256	0	6	2	1	0
13	340	0	7	2	2	0
14	363	0	4	1	1	1
15	257	0	5	1	1	1
16	320	0	7	1	1	0
17	280	0	6	2	0	0
18	303	0	6	1	0	0
19	339	0	7	1	1	1
20	330	0	5	1	0	0

GRUPO 2 - IRRADIADO E MARCADO APÓS 2 DIAS
DOSE 1200cGy

<i>Nº RATO</i>	<i>PESO</i>	<i>DOSE</i>	<i>TEMPO DE COLORAÇÃO</i>	<i>Nº GÂNGLIOS CORADOS</i>	<i>ATROFIA DA MUCOSA</i>	<i>DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA</i>
21	293	1200	12	1	1	0
22	289	1200	10	1	3	1
23	276	1200	5	1	0	1
24	318	1200	5	1	0	1
25	289	1200	5	1	1	0
26	274	1200	6	1	1	1
27	255	1200	5	1	0	1
28	265	1200	7	1	0	1
29	286	1200	5	1	1	0
30	279	1200	15	1	1	1
31	282	1200	5	1	0	1
32	259	1200	5	1	0	1
33	309	1200	8	1	1	1
34	304	1200	15	1	2	0
35	305	1200	11	1	1	1
36	292	1200	11	1	2	1
37	286	1200	5	1	1	1
38	281	1200	5	1	0	0
39	264	1200	5	1	1	1
40	270	1200	7	1	1	1

GRUPO 3 - IRRADIADO E MARCADO APÓS 2 DIAS
DOSES VARIADAS - 300cGy , 600cGy , 900cGy e 2400cGy

<i>Nº RATO</i>	<i>PESO</i>	<i>DOSE</i>	<i>TEMPO DE COLORAÇÃO</i>	<i>Nº GÂNGLIOS CORADOS</i>	<i>ATROFIA DA MUCOSA</i>	<i>DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA</i>
41	270	300	5	1	0	0
42	251	300	6	2	3	0
43	292	600	7	1	2	1
44	278	600	6	1	1	1
45	315	900	5	1	1	1
46	293	900	5	1	2	0
47	284	1200	10	1	3	1
48	272	1200	5	1	1	1
49	310	1200	5	1	1	1
50	285	1200	5	1	1	1
51	270	1200	6	1	1	1
52	250	1200	5	1	0	1
53	304	2400	5	1	1	1
54	256	2400	8	1	1	1
55	255	2400	6	1	1	1
56	264	2400	5	1	1	1
57	268	2400	5	1	1	1
58	248	2400	7	1	2	1

GRUPO 4 - IRRADIADO E MARCADO APÓS 7 DIAS
DOSES VARIADAS - 300cGy, 600cGy, 900cG e 1200cGy

<i>Nº RATO</i>	<i>PESO</i>	<i>DOSE</i>	<i>TEMPO DE COLORAÇÃO</i>	<i>Nº GÂNGLIOS CORADOS</i>	<i>ATROFIA DA MUCOSA</i>	<i>DEPLEÇÃO LINFOCITÁRIA</i>
59	426	1200	15	1	1	1
60	406	1200	12	1	1	1
61	402	1200	12	1	0	1
62	365	1200	11	1	1	1
63	272	900	11	1	2	0
64	312	900	10	1	1	1
65	363	900	5	1	1	0
66	369	900	5	1	0	1
67	318	600	7	1	1	1
68	278	600	16	1	0	1
69	316	600	10	1	1	0
70	358	600	5	1	1	1
71	300	300	6	2	2	0
72	311	300	6	1	1	1
73	314	300	5	1	0	0
74	354	300	5	1	1	0

9 – REFERÊNCIAS

1 - Adell CG , Zhang H , Evertsson S , Sun XF , Stal OH , Nordenskjöld BA. Apoptosis in rectal carcinoma : prognosis and recurrence after preoperative radiotherapy. *Cancer*, 2001; 91(10) : 1870-5.

2 - Arias VEA. Cinética celular e lesões proliferativas pré-malignas e malignas do epitélio mamário. Papel da apoptose, proteína BCL-2, produto de oncogene HER-2/NEU, proteínas reguladoras do ciclo celular e proliferação celular e proliferação celular : um modelo de progressão de doença. [Tese]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente, 2002.

3 - Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed. Cambridge: Blackwell Science, 1994.

4 - Belka C, Jendrossek V, Pruschy M, Vinik S, Verheij M, Budach W. Apoptosis-modulating agents in combination with radiotherapy-current status and outlook. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 58(2): 542-54.

5 - Behmer AO, Tolosa EMC, Freitas Netto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ed. São Paulo, EDART/USP; 1976.

6 – Bilchik AJ, Giuliano AE, Essner R et al. Universal application of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in solid neoplasms. *Cancer J Sci Am*, 1998, 4(6): 351-8.

7 - Bomford CK, Kunkler IH, Sherriff SB. Walter and Millers textbook of radiotherapy, radiation physics, therapy and oncology. London, Churchill Livingstone, 1993.p.253-63: Principles of radiobiology.

8 - Buschke F. What is radiotherapist? [Editorial]. Radiology. 1962;79:319-21.

9 - Bush RS. The complete oncologist: The Franz Buschke Lecture. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1982;8(6):1019-27.

10 - Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 1977, 39(2): 456-66.

11 - Camargo RS, Longato Filho A, Kanamura CT, Di Loreto C, Espósito JP, Firzzarinil R, Tolosa EMC. Identificação imunohistoquímica da proteína p53, Ki67 e PCNA em neoplasias tireoidianas. In: CONGRESSO SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE TIREOIDES. 7., Viña del Mar, 1997. Programa y Libro de Resúmenes. Viña del Mar, 1997.

12 - Cater DB, Silver IA. Quantitative measurements of oxygen tension in normal tissues and in the tumor of patients before and after radiotherapy. Acta Radiol. 1960;53:233-56.

13 - Cho CH, Kammerer RA, Lee HJ, Yasunaga K, Kim KT, Choi HH, Kim W, Kim SH, Park SK, Lee GM, Koh GY..Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(15): 5553-8.

14 - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Legislação e Ética [homepage on the Internet]. São Paulo; c2004 [update 2004; cited 2004 Dec 17]. [2 screens]. Available from: <http://www.cobea.org.br/ética.htm> .

15 - Cohen L. Radiation response and recovery: Radiobiological principles and their relation to clinical practice. In: Schwartz, E.E.R, editor.

The biological basis of radiation therapy. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1966.p.208-348.

16 - Cohen L. Theoretical “iso-survival” formulae for fractionated radiation therapy. Br J.Radiol. 1968;41(487):522-8.

17 - Costa RFG, Fagundes DJ. Modelos experimentais de hiperplasia intimal: efeitos da radiação ionizante. Acta Cir Bras. 2002; 17 (3):189-193.

18 - Dawson B, Trapps RG. Basic % clinical biostatistics. 2 nd ed. Norwalk : Appleton & Lange; 1994.

19 - Dawson B, Trapps RG. Bioestatística Básica e Clínica. 3 rd ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil LtdaNorwalk ; 2003.

20 - Del Regato JA. You have come a long way...! ASTRO 1975 presidential address. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1976;1(5/6):383-5.

21 – Diestel CF, Lopes-Paulo F, Marques RG, Horst NL, Caetano CER. Efeito da suplementação oral de l-glutamina na parede colônica de ratos submetidos à irradiação abdominal. Acta Cir Brás 2005;.20(supl.1):94-100.

22 - Dixon WJ, Massey Jr FJ. Introduction to statistical analysis. 3rd.ed. Kogakusha: McGraw-Hill, Japan, 1969.

23 - Dunne AL, Price ME, Mothersill C, Mckeown SR, Robson T, Hirst DG. Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. Br J Cancer. 2003; 89(12): 2277-83.

24 - Dutreix J, Wambersie A, Bounik C. Cellular recovery in human skin reactions: Application to dose, fraction number, overall time relationships in radiotherapy. *Eu.J Cancer*. 1973;9(3):159-67.

25 - Elkind MM. Repair processes in the treatment and induction of câncer with radiation. *Cancer*. 1990;65(10):2165-71.

26 - Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM. The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999, p.202-6.

27 - Fernández-Cebrián JM, Vorwald Kuborn P, Pardo De Lama M, Senjuanbenito Dehesa A, Nevado Santos M, Pacheco Martinez PA, Fernández-Escudero B. Current status of the prognostic value of molecular markers in patients with colorectal cancer and the prediction of response to adjuvant therapy. *Clin Transl Oncol*. 2005;7(3):101-9.

28 - Flinton D. Radiotherapy: Current Practice. In: CHERRY, P.; Duxbury, A. eds. *Practical Radiotherapy Physics and Equipment*.. London: Greenwich Medical Media Ltd; 1998. p.3 –7.

29 - Fowler JF. The second Klaas Breur memorial lecture: la ronde: radiation sciences and medical radiology. *Radiother Oncol*. 1983;1(1):1-22.

30 - Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994; 220(3):391-8.

31 - Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4.ed. New York: McGraw-Hill; 1996.

32 - Gomes RA, Leitão AC. Radiobiologia e fotobiologia. Rio de Janeiro, Gráfica da UFRJ, Instituto de Biofísica; 1986.

33 - Goytisolo FA, Samper E, Caballero JM, Finnon P, Herrera E, Flores JM., Bouffler SD, Blasco MA. Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. J.Exp Med. 2000;192(11):1625-36.

34 - Gunilla CB. Radiation therapy planning. 2nd. ed. New York: McGraw Hill;1996.

35 - Haddad CMK, Aisen S, Carvalho HA. Braquiterapia – Parte A: Física. In: Salvajoli, J.V.; Souhami, L.; Faria, S.L. editors. Radioterapia em Oncologia. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999; p.161-89.

36 – Hall EJ. Radiobiology for the Radiologist, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

37 - Hasegawa M, Imai R, Nojima K, Sakurai H, Suzuki Y, Kawashima M, Matsuura M, Nakamura Y, Nakano T. Radiation-induced apoptosis in vivo: therapeutic significance of apoptosis in radiation therapy. Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Kasshi. 2002;62(10): 535-9.

38 – Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, Tsai LM. Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. J Surg Res. 2003;109(2):149-54.

39 - International Commission on Radiation Units and Measurements(US). ICRU Report 50: prescribing, recording and reporting photon beam therapy. Bethesda: International Commission on Radiation Units and Measurements;1993:3.

- 40 - Johns HE, Cunningham JR. The Production and Properties of X-Rays. In: Johns, H.E.; Cunningham, JR. editors. The physics of radiology. Springfield : Charles Thomas; 1974a. p.22 – 58.
- 41 - Johns HE, Cunningham JR. High Energy and Teletherapy Machines. In: Johns, H.E.; Cunningham, JR. editors. The physics of radiology. Springfield : Charles Thomas; 1974b. p.103 – 134.
- 42 - Joosten JJ, Strobbe LJ, Wautera CA, Pruszczyński M, Wobbes T, Ruers TJ. Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma.Br J Surg, 1999; 86(4):482-6.
- 43 - Kastan MB, Zhang Q, El-Deiry WS. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell. 1992;71(4):587-97.
- 44 - Khan FM. Radiation protection. In: KHAN F.M. editor. The physics of radiation therapy. London: Williams & Wilkins; 1994a. p.32 – 70.
- 45 - Khan FM. Interactions of Ionizing Radiation. In: Khan F.M. editor. The physics of radiation therapy. London: Williams & Wilkins; 1994b. p.71 – 93.
- 46 - Khan FM, Potish RA. Treatment planning in radiation oncology, 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.
- 47 – Kiricuta IC.Sentinel node concept in breast cancer. Strahlenther-Onkol. 2000;176(7):307-14.
- 48 – Klimberg VS, Souba WW, Dolson DJ, Salloum RM, Hautamaki RD, Plumley DA, Mendenhall WM, Bova FJ, Khan SR, Hackett RL.

Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. Cancer. 1990;66(1):62-8.

49 - Kodner I, Myerson RJ. Preoperative radiation therapy for rectal cancer. In: Reis Neto JA. News Trends in Coloproctology. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter. 1a.ed.; 2000,p.385-99.

50 - Kleibl Z, Raisová M, Novotny J, Pohlreich P, Matous B. Apoptosis and its importance in the development and therapy of tumors (review). Sb Lek. 2002;103(1):1-13.

51 - Lehnert S. RADIOBIOLOGIA In: Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL editors. Radioterapia em Oncologia. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999; p.91-18.

52 - Leibel SA, Phillips TL. Textbook of Radiation Oncology, 1st ed. Philadelphia : W.B.Saunders Company; 1998.

53 - Lichter AS, Lawrence T. Recent advances in radiation oncology. N Engl J Med. 1995; 332(6):371-9.

54 - Maity A, Kao CD, Muschel RJ, McKenna WG. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1997;37(3):639-53.

55 - Mali JR, Stoduto G, Sabino FD, Carvalho ALL, Pacheco JS, Guimarães VG, Araujo ROC, Dias JÁ, Correa JHS, Castro LS. Mapeamento e biópsia de linfonodo sentinela no carcinoma epidermóide de canal anal: estudo piloto. Rev Bras Coloproct. 2005;25 supl 1:62.

56 - Margarido NF, Fernandes MR, Soares LA, Lupinacci RA, Tolosa EMC. Linfonodo sentinela de Reto. Marcação com azul patente.

Modelo experimental. In: Assembléia Cirúrgica Oncológica, do Colégio Brasileiro de Cirurgiões – Capítulo de São Paulo, 14. 2004. São Paulo. Programa. Rio de Janeiro: CBC, 2004. p. 61.

57 - Mariani G, Gipponi M, Moresco L, Villa G, Bartolomei M, Mazzarol G, Bagnara MC, Romanini A, Cafiero F, Paganelli G, Strauss HW. Radioguided sentinel lymphonode biopsy in malignant cutaneous melanoma. J Nucl Med. 2002; 43(6): 811-27.

58 - Marijen CA, Nagtegaal ID, Mulder-Stapel AA, Schrier P, ; Van De Velde CJ, Van Krieken JH, Peltenburg LT. High intrinsic apoptosis, but not radiation-induced apoptosis, predicts better survival in rectal carcinoma patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003; 57(2); 434-43.

59 - Marini P, Belka C. Death receptor ligands: new strategies for combined treatment with ionizing radiation. Curr Med Chem Anti-Canc Agents. 2003; 3(5); 334-42.

60 – Marks G, Mohiuddin M. The surgical management of the radiation-injured intestine. Surg North Am 1983; 63: 81-96.

61 – Martella E, Camargo RS, Tolosa EMC. A Biologia Molecular e a Radioterapia. Atualidades em Cancerologia. 1996; 8: 26-30.

62 - Martella E. Avaliação dos marcadores de proliferação celular em tireóides após irradiação externa. Estudo experimental em ratos recém desmamados da raça Wistar. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1998.

63 – Martin SJ, Green DR. Apoptosis as a goal of cancer therapy. *Curr Opin Oncol*. 1994; 6(6): 616-21.

64 - Milas L, Stephens LC, Meyn RE. Relation of apoptosis to cancer therapy. *In Vivo*. 1994; 8(5): 665-73.

65 - Minsk BD, Cohen AM, Enker WE et al. Radiation therapy for unressectable rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991; 21(5): 1283-9.

66 - Miura M. Relationship between apoptotic activity and radiosensitivity in solid tumors: does apoptosis always bring good clinical results? *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*. 2002; 62(10):545-8.

67 - Morton DL, Wen DR, Wong JH et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992; 339 : 392-9.

68 - Moss WT, Brand WN, Battifora H editors. Radiation oncology: rationale, techniques, results. 5.ed. St.Louis: Mosby;1979. p.24-5.

69 - Nadalin W, Aguilar PB, Habr-Gama A, Salvajoli JV. Tumores Colorretal e Canal Anal. In: Salvajoli JV, Souham, Faria SL editores. *Radioterapia em Oncologia*. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. p.583-600.

70 – Nagtegaal ID, Gaspar CG, Peltenburg LT, Marijnen CA, Kapiteijn E, Van De Velde CJ, Fodde R, Van Krieken JH. Radiation induces different changes in expression profiles of normal rectal tissue compared with rectal carcinoma. *Virchows Arch*. 2005; 446(2): 127-35.

71 - Nivatvongs S, Gordon PH. Principles and Practice of Surgery for the Colon, Rectum and Anus, 2nd ed. St Louis:Quality Medical Publishing. 1999. p 32 – 3 ; 720 – 1 ; 771 – 83.

72 – Pereira FEL. Etiopatogênese geral das lesões. In: Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000, p 19 – 37.

73 - Pereira MLL, Scheidt TC, Simões MJ, Mosquette R, Gomes PO. Oxigenoterapia hiperbárica em leões actínicas de colo de ratos. Aspectos morfológicos e morfométricos. Acta Cir Bras 2004;19(6): 658-63.

74 - Perez CA, Glasgow GP. Physics of Brachytherapy. In: Perez, CA.; Brady, L, editors. Principles and Practice of Radiation Oncology, 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1992. p.405-467.

75 - Perez CA, Brady WB. Principles and practice of radiation oncology. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott;1998.

76 - Piato JRM, Barros ACSD, Pincerato KM, Vigário AO, Pinotti JÁ. Acurácia do linfonodo sentinela em pacientes com câncer inicial de mama tratados com quimioterapia neoadjuvante. Rev Bras Ginecol Obstet. 2002; 24(2): 81-6.

77 - Pinheiro LGP, Moraes MO, Soares AH, Lopes AJT, Nagueire MASP, Gondin C. Estudo experimental de linfonodo sentinela em mama de cadela com azul patente e tecnésio Tc 99m. Acta Cir Brás. 2003;18 (6): 514-17.

78 - Pleskovic A, Zorc-Pleskovic R, Vraspir-Porenta O, Zorc M, Petrovic D. Colon mucosal cells after combined radiotherapy and chemotherapy. *Folia Biol. (Praha)*. 2001;47(5):156-62.

79 - Read J. Radiation biology of *vicia faba* in relation to the general problem. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1959.

80 - Reed JC. Apoptosis mechanisms: implications for cancer drug discovery. *Oncology (Williston Park)*. 2004; 18(13 suppl 10):11-20.

81 - Rosnier B. Fundamentals of Biostatistics. 4th ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company; International Thomson Publishing; 1995.

82 - Saha S, Wiese D, Beutler T. et al. Accuracy of diagnosis of micrometastases in colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1999; 18: 236.

83 - Saha S, Wiese D, Badin J, Beutler T, Nora D, Ganatra BK, Desai D, Kaushal S, Nagaraju M, Arora M, Singh T. Technical details of sentinel lymph node mapping in colorectal cancer and its impact on staging. *Ann Surg Oncol*. 2000; 7(2): 120-4.

84 - Scaff LAM. Física da Radioterapia – diagnóstico e terapia. São Paulo: Sarvier, 1997.

85 – Scott TE, Moellman JR. Intravenous glutamine fails to improve gut morphology after radiation injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1992;16(5):440-4.

86 - Seid VE, Cotti G, Bresciani E, Kruglensky D, Kiss D, Habr-Gama A, Gama-Rodrigues JJ. Estudo da distribuição anatômica de linfonodos no mesorreto. *Rev bras Coloproct*. outubro 2005; 25 (supl 1): 64.

87 - Urban CA, Lima RS, Schünemann Jr E, Hakim Neto CA, Yamada A, Torres LFB. Linfonodo sentinela : um novo conceito no tratamento cirúrgico do câncer de mama. Rev Col Bra Cir. 2001; 28(3): 216-22.

88 - Weichselbaum RR, Little JB. Radioresistance in some human tumor cells conferred “in vitro” by repair of potentially lethal x-ray damage. Radiology. 1982;145(2): 511-3.

89 - Wood TF, Saha S, Morton MD, Tsioulis GJ, Rangel D, JR WH, Foshag LJ, Bilchik AJ. Validation of lymphatic mapping in colorectal cancer: in vivo, ex vivo, and laparoscopic techniques. Ann Surg Oncol. 2001;8 (2): 150 – 157.