ANDRÉ RONCON DIAS

Impacto da solução de Carnoy no número de linfonodos resgatados em peças cirúrgicas de câncer gástrico: estudo prospectivo randomizado.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dias, André Roncon

Impacto da solução de Carnoy no número de linfonodos resgatados em peças cirúrgicas de câncer gástrico : estudo prospectivo randomizado / André Roncon Dias. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Ulysses Ribeiro Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias gástricas 2.Excisão de linfonodo 3.Solução de Carnoy 4.Solução reveladora de linfonodos 5.Estudos prospectivos 6.Distribuição aleatória 7.Linfonodos 8.Patologia/métodos

USP/FM/DBD-220/14

Aos meus pais,

por terem me fornecido os meios que tornaram tudo possível.

AGRADECIMENTOS

A Marina Alessandra Pereira, por ter dissecado as peças e coletado os dados. Sua dedicação incansável tornou esta tese possível.

Ao Professor Ulysses Ribeiro Júnior, por ter me estimulado a seguir este caminho, por sua orientação e por ser um exemplo de proficiência científica.

A Evandro Sobroza de Mello, que abraçou esta idéia, me orientou, revisou o texto e assegurou a boa integração com a patologia.

A Thaíse Yumie Tomokane e ao Professor Carlos Eduardo Pereira Corbett, que se esforçaram para fornecer a solução de Carnoy.

A Maura Lapa, seus cálculos, sua paciência e seu empenho em me entender, deram significado e relevância aos dados coletados.

A Paula Goldenstein Strassmann, pelo suporte nesta jornada e por colocar a *PGS statistics* à minha disposição.

A Victor Strassmann, por ser um exemplo de humildade e pela orientação.

A Osmar Kenji Yagi, por revisar o texto, por seus questionamentos e por nossas discussões que enriqueceram esta tese.

A Marta Regina Rodrigues, pelo esforço em conseguir os artigos necessários.

A Marcos Retzer, por sua capacidade de transformar idéias e conceitos complexos em ilustrações simples e eficazes.

A Vilma Libério e Fabiana Soares, pela ajuda com os trâmites burocráticos.

A Carlos Eduardo Jacob, por suas sugestões sempre precisas.

Aos meus colegas do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, seu alto grau de especialização e suas cirurgias minuciosas foram fundamentais para este estudo.

Aos residentes da Disciplina de Cirurgia do Aparelho Digestivo do HCFMUSP, pela ajuda com o estudo, por cuidarem dos pacientes e por servirem de estímulo para que eu continue buscando saber mais, para poder lhes ensinar mais.

Aos meus colegas do grupo de Cirurgia do Estômago do HCFMUSP, por compartilharem seu conhecimento. O convívio com vocês é um estímulo constante a melhorar.

Aos pacientes que participaram do estudo, por seu altruísmo.

Ao Professor Ivan Cecconello, por ter mantido as portas do Departamento de Gastroenterologia sempre abertas.

Ao Professor Bruno Zilberstein, pelos seus ensinamentos e apoio, por estar sempre acessível e por ter me recebido desde sempre com todo o carinho. Um verdadeiro mestre.

A Luciana Bastos Valente Alban, pela revisão do texto, pelas sugestões, pela paciência e por me inspirar a ser sempre uma pessoa melhor. Deixá-la orgulhosa é um dos objetivos da minha vida.

A João Baptista Dias Neto, meu avô querido, pelo suporte durante a redação desta tese, pelo carinho e convívio intenso, especialmente nesses últimos 14 anos. Você me ensinou o que é dedicação.

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem feita, ou não faz.”

Ayrton Senna

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de símbolos
Resumo
Abstract
1. Introdução **1**
1.1. Câncer gástrico 2
1.2. Tratamento do câncer gástrico 3
1.3. Espécime cirúrgico 6
1.4. Soluções clareadoras de gordura 7
1.5. A solução de Carnoy 8
1.5.1. A solução de Carnoy como fixadora de tecidos 9
1.5.2. A solução de Carnoy como reveladora de linfonodos 11
1.5.3. Risco ocupacional da solução de Carnoy 12
1.5.4. Aquisição da solução de Carnoy 13
2. Objetivos do estudo **17**
2.1. Objetivo principal 17
2.2. Objetivos secundários 17
3. Métodos **18**
3.1. Análise prospectiva e randomizada 19
3.2. Análise patológica 22
3.2.1. Avaliação macroscópica 22
3.2.2. Processamento, inclusão e cortes histológicos 23
3.2.3. Coloração e montagem 23
3.2.4. Avaliação microscópica 24
3.2.5. Coleta dos dados patológicos 25
3.3. Análise retrospectiva 25
3.4. Análise estatística 26

4. Resultados **28**
4.1. Homogeneidade dos grupos 29
4.2. Duração da dissecção linfonodal 30
4.3. Número de linfonodos encontrados 31
4.4. Linfonodos no grupo Revisão 31
4.5. Linfonodos <5mm 32
4.6. Influência das variáveis sexo, idade e IMC 33
4.7. Estádio clínico patológico 34
4.8. Análise retrospectiva 34
4.9. Custo financeiro 36
5. Discussão **37**
6. Conclusões **50**
7. Anexos **52**
8. Referências **66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP	*College of American Pathologists*
Carnoy	Solução de Carnoy
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
Ed.	Edição
Formalina	Formalina neutra tamponada a 10%
GIST	Tumor estromal gastrointestinal
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IHQ	Imunohistoquímica
IMC	Índice de massa corpórea
JGCA	*Japanese Gastric Cancer Association*
LN	Linfonodo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Vs	Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
ºC	graus Celsius
mm	milímetro
µm	micrômetro
mg/m3	miligrama por metro cúbico
h	hora
min	minutos
ppm	partes por milhão
=	igual a
±	mais ou menos
<	menor que
≤	menor ou igual a
>	maior
≥	maior ou igual a
R$	real (moeda)

RESUMO

Dias, AR. Impacto da solução de Carnoy no número de linfonodos resgatados em peças cirúrgicas de câncer gástrico: estudo prospectivo randomizado [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014.

Introdução: O adenocarcinoma gástrico é uma doença de elevada incidência e alta mortalidade. A gastrectomia com linfadenectomia é tratamento potencialmente curativo, promovendo controle loco-regional da doença e fornecendo material para análise histopatológica. Para o adequado estadiamento dos pacientes é recomendado que pelo menos 16 linfonodos sejam examinados pela patologia, entretanto, espera-se maior sobrevida quando ≥30 linfonodos são avaliados, mesmo em pacientes com tumores precoces. A justificativa para este achado é o sub-estadiamento de pacientes com poucos linfonodos examinados. Linfonodos pequenos são particularmente difíceis de serem encontrados, mas podem conter metástases e impactar negativamente na sobrevida. Visando facilitar sua identificação, soluções clareadoras de gordura foram propostas, entretanto não há evidência clara de seu benefício clínico. **Objetivos:** Comparar as soluções de Carnoy e de formalina neutra tamponada em relação ao número absoluto de linfonodos encontrados na peça cirúrgica de pacientes submetidos a gastrectomia. Averiguar se linfonodos retirados cirurgicamente são perdidos com a fixação em formalina e, caso isso ocorra, se este fato é relevante para o estadiamento. Observar se o protocolo de pesquisa influenciou o número de linfonodos encontrados. **Métodos:** Cinquenta produtos de gastrectomia subtotal com linfadenectomia D2 por adenocarcinoma gástrico foram randomizados para fixação em Carnoy ou formalina com posterior dissecção da peça em busca de linfonodos. Após a dissecção do grupo Formalina, a gordura residual a ser desprezada foi imersa em Carnoy e reavaliada posteriormente. Os dados de 25 gastrectomias D2 operadas previamente ao estudo também foram avaliados. **Resultados:** A média de linfonodos encontrados nos grupos Carnoy e Formalina foi de 50,4 e 34,8; respectivamente (p<0,001). Na gordura residual foram encontrados linfonodos em todos os casos (média 16,9 linfonodos), elevando a média do grupo Formalina para 51,7 (valor similar ao do grupo Carnoy, p=0,809). Com exceção de 1 linfonodo de 7mm, todos os demais encontrados na gordura residual mediram ≤3mm. Treze linfonodos metastáticos passaram despercebidos com a fixação em formalina e a revisão da gordura residual determinou a mudança de estadiamento de 2 (8%) pacientes. Os linfonodos encontrados no Carnoy possuíam tamanho significativamente menor quando comparados aos do grupo Formalina (p=0,01). A média de linfonodos encontrados no grupo retrospectivo foi similar ao do grupo Formalina prospectivo (p=0,802). **Conclusões**: Quando comparada à formalina, a solução de Carnoy permite encontrar número maior de linfonodos no espécime cirúrgico de gastrectomias com linfadenectomia. Linfonodos milimétricos foram perdidos após a fixação em formalina, estes foram identificados com o Carnoy e são clinicamente relevantes, pois podem conter metástases modificando assim, o estádio clínico e prognóstico do paciente. A implementação de protocolo de pesquisa não influenciou o número de linfonodos encontrados neste estudo.

Descritores: neoplasias gástricas, excisão de linfonodo, solução de Carnoy, solução reveladora de linfonodos, estudos prospectivos, distribuição aleatória, linfonodos, patologia/métodos.

ABSTRACT

Dias, AR. Impact of Carnoy's solution in lymph node retrieval following D2 gastrectomy for gastric cancer: prospective randomized trial [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2014.

Background: Gastric adenocarcinoma is a frequent disease with high mortality ratio. Gastrectomy with lymphadenectomy is potentially curative, allows local control of the disease and provides material for TNM classification. While pathology examination of at least 16 lymph nodes is recommended following surgery, longer survival rates are expected when ≥30 lymph nodes are examined, even for early gastric cancer. The understaging of patients with less examined lymph nodes justifies this findings. Small lymph nodes are particularly difficult to identify and fat clearing solutions have been proposed to improve this, but there is no evidence of their clinical benefit. **Objectives:** Compare Carnoy's solution (CS) and formalin in terms of the total number of examined lymph nodes following gastrectomy. Verify if surgically retrieved lymph nodes are lost with the formalin fixation and if this fact is clinically significant. Observe if a research protocol influences the number of examined lymph nodes. **Methods:** Fifty specimens of gastrectomy with D2 lymphadenectomy were randomized for fixation in CS or formalin with posterior dissection in search for lymph nodes. In the Formalin group, the residual fat to be discarded was immersed in CS and dissected again. Data from 25 D2 gastrectomies performed previously the present study were retrospectively analyzed. **Results:** The medium number of examined lymph nodes was 50.4 and 34.8 for CS and formalin, respectively ($p<0.001$). Lost lymph nodes were found in all cases in the Residual Fat group (medium 16.9), this increased the Formalin group average to 51.7 (which is similar to the CS group, $p=0.809$). With one exception (7mm), all other examined lymph nodes in the Residual Fat group measured ≤3mm. Thirteen lymph nodes from this group were metastatic, this determined the upstaging of 2 (8%) patients. Lymph nodes from the CS group were smaller than those found in the formalin group ($p=0.01$). The medium number of retrieved lymph nodes in the retrospective group was similar to the formalin group ($p=0.802$). **Conclusions**: When compared to formalin, Carnoy's solution increases lymph node detection following gastrectomy with lymphadenectomy. CS identifies small lymph nodes lost with formalin fixation and that are clinically significant, since they may contain metastasis, modifying the TNM classification. No influence of the research protocol over the number of examined lymph nodes was observed in the present study.

Descriptor: stomach neoplasms, lymph node excision, Carnoy's solution, lymph node revealing solution, prospective studies, random allocation, lymph nodes, pathology/methods.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer gástrico

O câncer gástrico é uma das doenças mais prevalentes do mundo.[1] No Brasil esta afecção corresponde à 3ª e 5ª neoplasia maligna mais incidente em homens e mulheres, respectivamente.[2] Estima-se que em 2014 surgirão 20.390 casos novos no Brasil, sendo 12.870 em homens e 7.520 em mulheres.[2] Adicionalmente, o câncer gástrico possui alta mortalidade, sendo que 13.328 brasileiros faleceram em decorrência desta doença em 2011.[2]

Dentre as neoplasias malignas do estômago, o adenocarcinoma é o tipo histológico mais frequente, representando cerca de 90-95% dos casos. Outros tipos histológicos menos comuns são o linfoma (4%), o tumor neuroendócrino (3%) e o tumor estromal (GIST) (2%).[3] Nesta tese considerou-se câncer gástrico como sinônimo de adenocarcinoma.

Em termos prognósticos, o fator que mais influencia a sobrevida do paciente com câncer gástrico é o estádio clínico da doença no momento do diagnóstico.[3-10] Estádio se refere à classificação do câncer de acordo com o TNM (Tumor, Linfonodos e Metástases) conforme proposto pelo *American Joint Comittee on Cancer* e *Union for International Cancer Control* (AJCC/UICC).[12] As Tabelas 1 a 4 (páginas 53 e 54) revelam o TNM e os estádios clínicos para o câncer gástrico, enquanto os Gráficos 1 e 2 (página 55) demonstram a associação entre a curva de sobrevida e os estádios.

1.2. Tratamento do câncer gástrico

O tratamento do câncer gástrico é primordialmente cirúrgico, seja ele com intuito curativo ou paliativo.[13, 14] Exceções são tumores gástricos precoces (restritos a mucosa e submucosa) que preenchem critérios específicos para ressecção endoscópica e pacientes muito debilitados ou com lesões não passíveis de ressecção ou paliação cirúrgica.[13, 15, 16]

A cirurgia curativa mais adequada é a gastrectomia parcial ou total (Figura 1, página 56) em monobloco com eventuais estruturas comprometidas e englobando também o tecido linfonodal adjacente ao estômago (linfadenectomia). Os fatores que determinam a extensão da ressecção, se parcial ou total, são a localização da neoplasia e seu grau de diferenciação. Deve-se ressecar o tumor com margens livres e lesões menos diferenciadas requerem margens maiores.[13, 15]

A linfadenectomia é fundamental no câncer gástrico, uma vez que os linfonodos são o primeiro local de disseminação da doença. Ademais, o número de gânglios linfáticos comprometidos pela neoplasia se correlaciona fortemente com a sobrevida.[4, 6-11, 17-19] Considerando apenas pacientes com metástases linfonodais, Fang et al.[8] relataram a diferença estatisticamente significativa de sobrevida em 5 anos: 71,4% (N1); 44,1% (N2); 27,6% (N3a) e 11,3% (N3b).

O estômago possui 23 cadeias de drenagem linfonodal (Figura 2 e Tabela 5, páginas 56 e 57) e a extensão da linfadenectomia pode ser nomeada D1, D2 ou D3, de acordo com as cadeias ganglionares ressecadas.[20] Embora a extensão da linfadenectomia seja discutida há décadas, em nossa instituição adotamos como padrão a D2, conforme proposto pela *Japanese Gastric Cancer Association* (JGCA), uma vez que os resultados disponíveis mundialmente confirmam esta

dissecção como a mais adequada e com melhor relação risco/sobrevida.[21-24] Casos selecionados podem se beneficiar de dissecções mais restritas (tumores iniciais) ou mais amplas (lesões muito avançadas).[13, 15, 24-26]

A linfadenectomia D2 tem como princípio a retirada das cadeias linfonodais com alto e moderado risco de comprometimento pela neoplasia, de acordo com a localização do adenocarcinoma (Tabela 6, página 58).[27] Desse modo, cadeias distintas são retiradas se a lesão for distal ou proximal (Tabela 7, página 58).[13] A Figura 3 ilustra a gastrectomia com linfadenectomia D2.

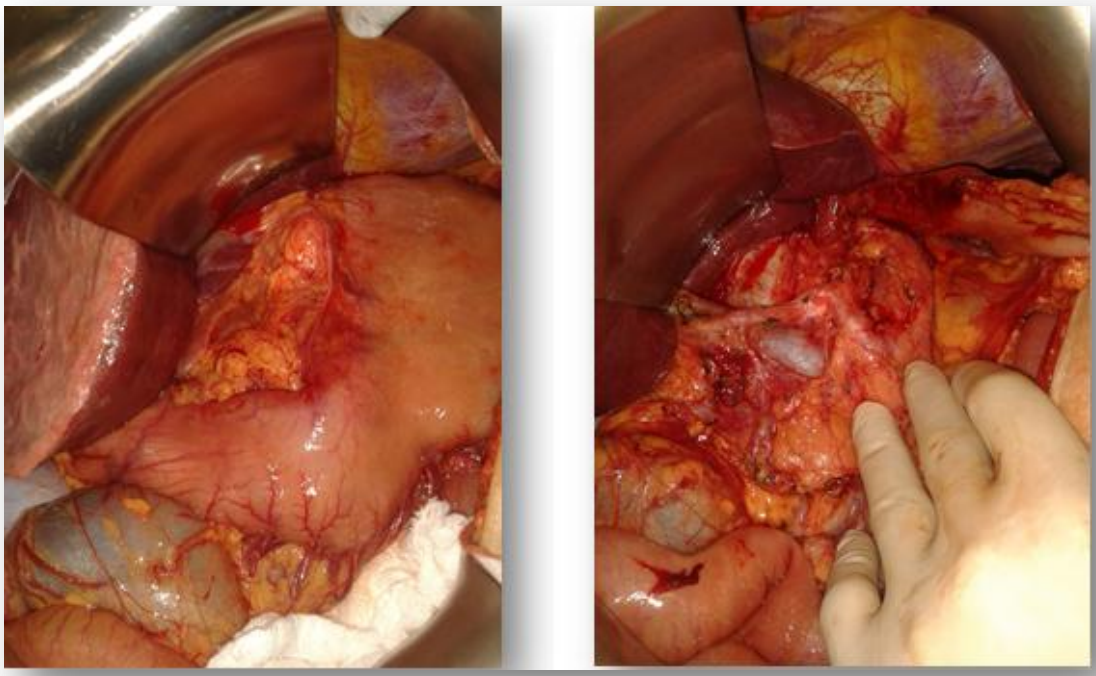


Figura 3 – Campo cirúrgico antes e após a gastrectomia subtotal com linfadenectomia D2

A linfadenectomia permite o controle loco-regional do câncer gástrico e fornece material linfonodal para análise histopatológica, de modo a permitir o estadiamento adequado e, desse modo, possibilitar

que pacientes com doença mais avançada sejam indicados para complementar seu tratamento através de terapia adjuvante (quimioterapia associada ou não à radioterapia). Após a gastrectomia com linfadenectomia é preconizado que pelo menos 16 linfonodos sejam analisados, entretanto estudo em cadáveres demonstrou que pelo menos 25 linfonodos poderiam ser esperados após uma linfadenectomia D2.[28-30] Além disso, o número de linfonodos encontrados no espécime cirúrgico é fator independente de prognóstico, sendo que para o mesmo estádio, a sobrevida é menor naqueles pacientes com menos gânglios linfáticos examinados.[12, 29-36] Este fato é válido inclusive nas lesões iniciais. Ichikura et al.[30] observaram maior sobrevida em pacientes estádio IA quando 30 ou mais linfonodos foram avaliados. Em nossa instituição, Jacob[36] observou que há maior chance de encontrar linfonodos metastáticos em pacientes com câncer gástrico precoce, quando 30 ou mais gânglios linfáticos são examinados (18,1% vs 6,6%; p=0,02). Essa maior precisão no estadiamento patológico, quando pelo menos 30 linfonodos são analisados, também é desejável nas lesões avançadas, aumentando a acurácia da classificação da categoria N do TNM.[30, 32, 37]

Frente a estes achados, se pode inferir que pacientes com poucos linfonodos encontrados foram sub-estadiados, seja porque a linfadenectomia foi inadequada e linfonodos positivos ficaram no paciente ou porque a análise patológica da peça foi insuficiente, deixando linfonodos metastáticos ressecados passarem despercebidos.

O número de linfonodos examinados depende da variabilidade individual, da extensão da linfadenectomia e da análise da peça cirúrgica.[28] Como não se pode atuar sobre o primeiro fator, esforços devem ser direcionados no treinamento das equipes envolvidas na

cirurgia e na análise patológica.[31] De fato, centros de referência e equipes especializadas têm resultados melhores em termos de número de linfonodos ressecados e sobrevida.[38, 39] Desse modo, após a padronização da cirurgia, resta considerar se a análise da peça cirúrgica está sendo adequada.

1.3. Espécime cirúrgico

Após a gastrectomia com linfadenectomia, o espécime cirúrgico consiste no estômago com a gordura perivisceral (Figura 4, página 7). Os linfonodos ficam em meio à essa gordura e encontrá-los é uma tarefa exigente e que consome tempo. Além disso, gânglios linfáticos pequenos são particularmente difíceis de serem identificados e podem passar despercebidos.[40-44] Estes, por sua vez, podem conter metástases que eventualmente alterariam o estádio clínico do paciente.[29, 33, 45-50]

Para a busca linfonodal, a JGCA recomenda dissecar a peça a fresco. O estômago é separado da gordura perivisceral e esta é seccionada e palpada em busca de estruturas nodulares. Os supostos gânglios linfáticos encontrados são identificados conforme a cadeia linfonodal correspondente. Após esta etapa, todo o conjunto é fixado em formalina neutra tamponada a 10% (formalina), que equivale a formaldeído a aproximadamente 4%.[13, 51] No Serviço de Cirurgia do Estômago do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) a dissecção a fresco foi o padrão até 2006. A partir de 2007 esta rotina foi modificada, as cadeias linfonodais passaram a ser separadas e identificadas a fresco (Figura 4, página 7) e então fixadas em formalina, com posterior dissecção pela equipe da

patologia. Essa metodologia é a utilizada no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) desde sua criação em 2008.

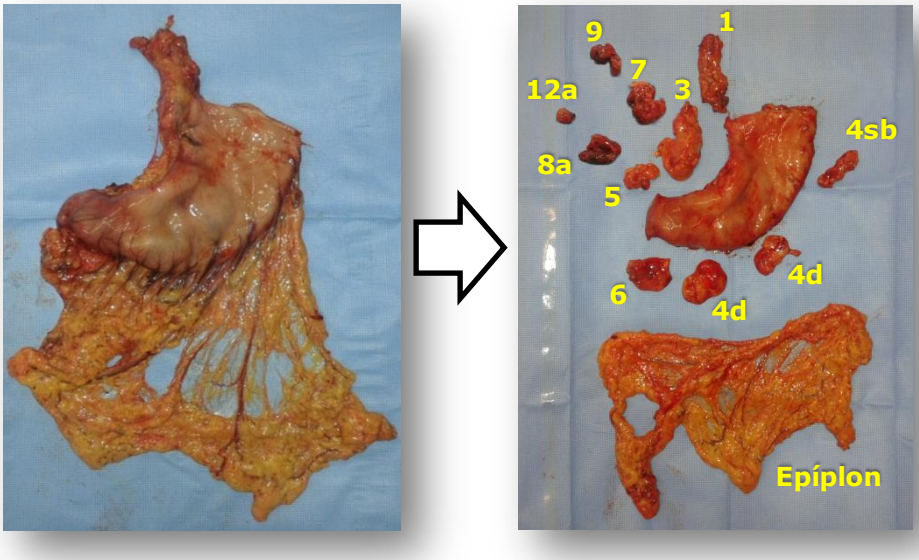


Figura 4 – Espécime cirúrgico da gastrectomia subtotal com linfadenectomia D2 antes e após a separação das cadeias linfonodais a fresco

1.4. Soluções clareadoras de gordura

Visando facilitar a identificação dos linfonodos, soluções ditas "clareadoras de gordura" ou "reveladoras de linfonodos" foram propostas. Estas contêm álcool que extrai os fosfolípides das células, que são o principal componente da membrana celular. Desse modo, o interior das células fica mais evidente, sendo mais fácil identificar os gânglios linfáticos.[41-44, 52] Apesar de promissor, poucos artigos científicos sobre o uso dessas soluções estão disponíveis na literatura mundial e os resultados são contraditórios.[40-44] Também não há evidência consistente de que ao encontrar na peça cirúrgica linfonodos que estariam passando despercebidos, isso seja clinicamente significativo. Seria se esses linfonodos contivessem metástases e este fato alterasse o estádio clínico do paciente para

grupo mais avançado (*upstage*) determinando mudanças no tratamento e seguimento.

A única revisão sistemática disponível sobre o tema considerou diferentes métodos que visam aumentar o número de linfonodos obtidos em espécimes cirúrgicos de pacientes com câncer gastrointestinal. Apenas o uso de soluções clareadoras de gordura e a injeção intra-operatória de azul de metileno foram eficazes. Entretanto, não houve evidência de que o acréscimo de linfonodos examinados seja clinicamente relevante. Vale também ressaltar que a metodologia encontrada na maioria dos estudos incluídos foi pobre.[40]

1.5. A solução de Carnoy

A fixação do espécime cirúrgico é passo fundamental, pois previne a autólise e o crescimento de microorganismos, preserva a morfologia e estabiliza proteínas e ácidos nucléicos, permitindo a análise futura.[51] A fixação química é o método mais utilizado, sendo que a formalina é a solução mais frequentemente utilizada.

Em 1851, Clark propôs uma solução para fixar tecidos que consistia de álcool (vinho originalmente) e ácido acético na proporção de 3:1.[53] Uma derivação desta fórmula foi introduzida em 1884 pelo belga Jean-Baptiste Carnoy (Figura 5, página 9), consistindo em álcool absoluto (etanol), clorofórmio e ácido acético glacial (puro) na proporção de 6:3:1.[54] Curiosamente, Jean-Baptiste além de cientista era padre católico romano.

Figura 5 – Jean-Baptiste Carnoy (1836–1899)

Dos componentes da solução de Carnoy, o etanol (CH_2H_5OH) é um fixador coagulativo que denatura proteínas insolúveis em água em temperatura ambiente, extrai fosfolípides das células e não afeta os carboidratos. Já o ácido acético (CH_3COOH) penetra rapidamente nos tecidos e tem como papel preservar os cromossomos através da coagulação dos ácidos nucléicos.[53] Além disso, o ácido acético quebra os elos entre as proteínas e libera radicais hidrófilos edemaciando o tecido, propriedade que previne encolhimento e endurecimento excessivos ocasionados pela ação do etanol.[55] O clorofórmio ($CHCl_3$) têm como função agilizar a lenta penetração do etanol no tecido. Isto se deve à sua natureza extremamente hidrofóbica que gera uma rápida desidratação tecidual.[56]

1.5.1. A solução de Carnoy como fixadora de tecidos

Apesar de escassa, a literatura demonstra a eficácia da solução de Carnoy em fixar tecidos.

Quanto à morfologia, estudo de 1968 já demonstrava que o Carnoy era um fixador adequado para tecidos humanos, permitindo menor encolhimento tecidual em relação à formalina.[57] Já estudo realizado em nossa instituição não observou diferença entre a formalina e o Carnoy nos cortes histológicos de tecido gástrico corados com Hematoxilina e Eosina (H&E).[52] O desempenho das soluções também foi similar em tecido intestinal humano, enquanto estudo com tecido ovariano bovino observou que a morfologia deste foi mais bem preservada com a fixação em Carnoy quando comparada à em formalina.[58, 59]

Em relação a testes de imunohistoquímica (IHQ) comparou-se o efeito de sete fixadores de tecido na expressão de antígenos de grupos sanguíneos de secções embebidas em parafina. Os autores notaram que a intensidade da reação foi similar entre os tecidos fixados em Carnoy e em formalina.[58] Ambas as soluções também foram semelhantes na análise imunocitoquímica para receptor de estrógeno em esfregaços de carcinoma de mama.[59] Outros autores também demonstraram que o Carnoy não compromete reações de IHQ em modelos animais ou em fígado de cadáveres humanos.[62-64]

Outro ponto fundamental é a capacidade do fixador de preservar o DNA. Neste quesito, a literatura demonstra a superioridade de fixadores que contém álcool em relação aos baseados em aldeídos.[56, 62,65-69] Tecidos humanos (glóbulos brancos normais, sarcoma, células de leucemia e carcinoma) foram fixados em 2 soluções baseadas em aldeídos (formalina e glutaraldeído a 1%) e 2 baseadas em álcool (Carnoy e metacarn). A solução de metacarn tem a mesma fórmula da de Carnoy, porém o metanol substitui o etanol. O estudo observou que as soluções alcóolicas causaram menor dano ao DNA e forneceram melhores produtos de

reação de polimerização em cadeia (PCR) em termos de concentração e amplificação.[56]

Em estudo realizado no ICESP e que atualmente se encontra em consideração para publicação, Pereira et al.[70] compararam as soluções de Carnoy e formalina em pacientes com câncer colorretal. As soluções foram equivalentes em termos de preservação da morfologia; pureza, integridade e concentração de DNA genômico; desempenho em IHQ para genes de reparo do DNA; além de PCR e sequenciamento para o gene kras.

1.5.2. A solução de Carnoy como reveladora de linfonodos

Por conter etanol, a solução de Carnoy pode ser utilizada para destacar linfonodos em meio ao tecido adiposo (Figuras 6 e 7, páginas 11 e 12).

Figura 6 – Cadeia linfonodal fixada em Carnoy: linfonodos se destacam como nódulos esbranquiçados

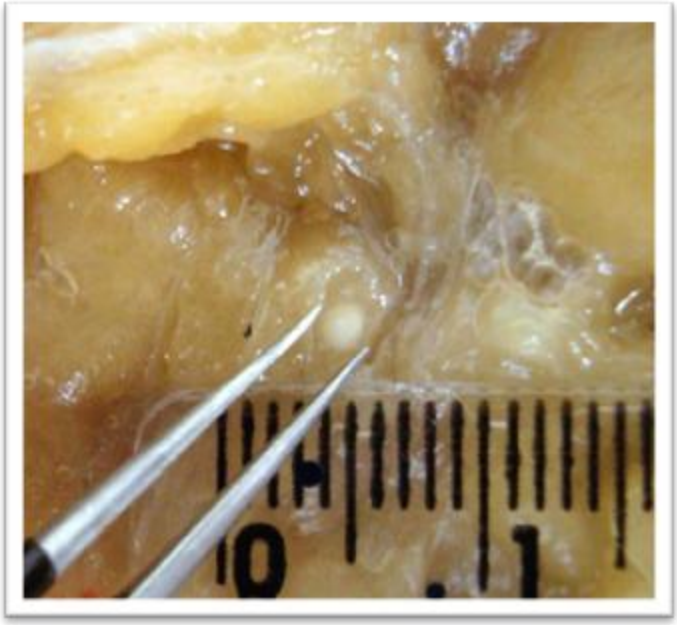


Figura 7 – Linfonodo milimétrico após fixação em Carnoy

O uso do Carnoy como solução reveladora de linfonodos foi estudado em nossa instituição por Luz et al.[52] que analisaram a gordura peri-gástrica de 22 cadáveres. O tecido foi fixado de modo aleatório em formalina ou Carnoy por 4 dias, sendo posteriormente dissecado em busca de linfonodos. Os autores notaram que nos casos do grupo Carnoy, os gânglios linfáticos se destacavam como nódulos brancos em meio ao tecido gorduroso, facilitando especialmente a identificação de linfonodos diminutos (<5mm). A média de linfonodos ± o desvio padrão (DP) foi de 8,27±3,95 e 22,54±15,75 para formalina e Carnoy, respectivamente. Estes achados foram estatisticamente significativos (p=0,003) e inspiraram o presente estudo.

1.5.3. Risco ocupacional da solução de Carnoy

O risco ocupacional e as medidas necessárias para a manipulação da solução de Carnoy foram investigados previamente

ao início deste estudo. Ao compará-la com a solução de formalina, as mesmas recomendações de transporte, armazenamento e manuseio se aplicam, sendo que o risco ocupacional do Carnoy pode ser considerado inferior ao da formalina (Tabela 8). De acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* do *Centers for Disease Control and Prevention* norte americano, a formalina é um conhecido carcinógeno humano, enquanto o clorofórmio é um provável carcinógeno.[71] Tanto a formalina quanto o etanol são combustíveis e devem ser armazenados devidamente identificados, em temperatura ambiente, num local seco e sem insolação. Deve-se prevenir o contato das duas soluções (formalina e Carnoy) com a pele e os olhos, e ambas devem ser manipuladas sob uma capela de exaustão. O patamar de exposição ocupacional permitido para turno de 8 horas de trabalho é de 1ppm (1,2 mg/m3) e 2ppm (9,9 mg/m3) para formalina e clorofórmio, respectivamente.[72-73]

Tabela 8 – Risco ocupacional e cuidados recomendados para as soluções de formalina e Carnoy.

	Formalina	Carnoy
Carcinógeno	Conhecido	Provável
Exposição (8h)	1ppm (1,2mg/m^3)	2ppm (9,9mg/m^3)
Cuidados recomendados	- Prevenir contato com pele e olhos - Manipular sob capela de exaustão - Armazenar em local seco e sem insolação	

1.5.4. Aquisição da solução de Carnoy

A maioria dos fornecedores não possui a solução de Carnoy pronta, sendo necessário comprar separadamente seus ingredientes e solicitar que estes sejam misturados na proporção correta, sob as

devidas recomendações. Além disso, a aquisição do clorofórmio é relativamente complexa. Este é um líquido denso e incolor, com odor adocicado.[74] Ele é naturalmente produzido por algas marinhas (como subproduto da fotossíntese), mas também pode ser feito industrialmente.[75] Este trihalometano pode ser utilizado como solvente ou reagente químico e já esteve envolvido na fabricação de refrigerantes e pasta de dente.[74, 76, 77] Por ser um provável carcinógeno, seu uso em produtos cotidianos tem sido abandonado, apesar de que ainda hoje pode ser encontrado em xaropes para tosse no Reino Unido. [71]

Em 1847, o obstetra escocês James Young Simpson (Figura 8) descobriu que o clorofórmio é um depressor do sistema nervoso central. Ele foi o pioneiro em aliviar a dor do parto com anestésico, fato polêmico para a época, mas que se tornou corriqueiro após 1853, quando a rainha Victória recebeu clorofórmio no parto do príncipe Leopoldo.[78] Graças à sua descoberta, Simpson foi o primeiro na história a ser agraciado com o título de cavalheiro (*sir*) por serviços prestados à medicina (1866).[78]

Figura 8 – *sir* James Young Simpson (1811-1870)

O uso do clorofórmio como anestésico se propagou rapidamente, porém sua toxicidade e o risco de causar arritmia fatal fez com que ele fosse abandonado.[79, 80]

O clorofórmio também foi utilizado por criminosos para roubar e assassinar.[81] Essa associação com o crime foi incorporada e divulgada pela ficção, sendo reproduzida à exaustão a cena de uma pessoa ficando inconsciente após respirar por breves segundos um pano embebido com a solução. Entretanto, seu status de droga do "nocaute" é irreal, uma vez que seriam necessários alguns minutos para que alguém efetivamente perdesse o nível de consciência desse modo.[82]

O clorofórmio também pode ser utilizado como droga recreativa. No carnaval brasileiro de 1906, a empresa francesa Rhodia introduziu uma essência perfumada com clorofórmio, o "lança-perfume". Este se tornou um símbolo do carnaval até ser proibido em 1961, devido a mortes por parada cardíaca.[83, 84] Desde então, há restrições quanto à aquisição do clorofórmio em nosso país e volumes maiores são restritos a pessoas jurídicas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O presente estudo se baseou nos achados da literatura, na segurança da solução de Carnoy e no possível benefício clínico de se encontrar mais linfonodos nos pacientes operados por câncer gástrico.

2.1. Objetivo principal

Comparar as soluções de Carnoy e de formalina em relação ao número absoluto de linfonodos encontrados na peça cirúrgica de pacientes submetidos a gastrectomias subtotais com linfadenectomia D2 por câncer gástrico.

2.2. Objetivos secundários

1. Observar se há diferença no tempo dedicado à dissecção dos linfonodos após fixação da peça em Carnoy e formalina.

2. Verificar se há diferença de tamanho entre os linfonodos encontrados com as soluções de Carnoy e de formalina.

3. Averiguar se linfonodos retirados cirurgicamente são perdidos com a fixação em formalina e, caso isso ocorra, se este fato é relevante para o estadiamento patológico.

4. Observar se o estabelecimento de protocolo de pesquisa influencia o número de linfonodos encontrados.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1. Análise prospectiva e randomizada

Cinquenta espécimes de gastrectomia subtotal com linfadenectomia D2 foram randomizados para fixação em formalina neutra tamponada a 10% (grupo Formol) ou solução de Carnoy (grupo Carnoy).

Todos os pacientes foram operados no ICESP, entre agosto de 2012 e fevereiro de 2014. Os procedimentos foram realizados por cirurgiões especializados, todos alheios quanto ao destino da peça.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP, em 11 de julho de 2012, sob o número 209/12. No dia anterior ao procedimento cirúrgico, todos os pacientes candidatos a serem submetidos à gastrectomia subtotal com linfadenectomia D2, assinaram o termo de consentimento informado (Anexos L, M e N, páginas 59 a 61).

Ao término de cada operação, um membro da equipe cirúrgica separou a gordura perivisceral gástrica e identificou as cadeias de drenagem linfonodal, conforme previamente descrito na seção *Espécime Cirúrgico* da *Introdução*. Após esta etapa, verificou-se por telefone, junto à empresa responsável pela análise estatística do estudo, em qual braço do estudo a peça seria incluída, sendo esta imersa na solução determinada pela randomização e então encaminhada à Patologia.

Conjuntamente à solicitação de avaliação anatomopatológica, foi encaminhada a ficha do protocolo, sinalizando a inclusão da peça no estudo (Anexos O e P, página 62). Os dados coletados nesta etapa

foram: nome do paciente, idade, sexo, registro no HCFMUSP, índice de massa corpórea (IMC), localização da lesão, data e detalhes da operação, solução fixadora, data e horário do início da fixação, dentre outros.

As peças foram fixadas nas soluções por 24 a 48 horas, sendo posteriormente analisadas conforme a rotina do ICESP, seguindo o protocolo proposto pelo *College of American Pathologists* (CAP), descrito em detalhes na seção *Avaliação Patológica*, mais adiante.[83]

Após a dissecção dos casos do grupo Formol, a gordura residual que é habitualmente desprezada, foi imersa em Carnoy por adicionais 24 a 48 horas, sendo dissecada novamente em busca de eventuais linfonodos que pudessem ter passado despercebido (Figura 9).

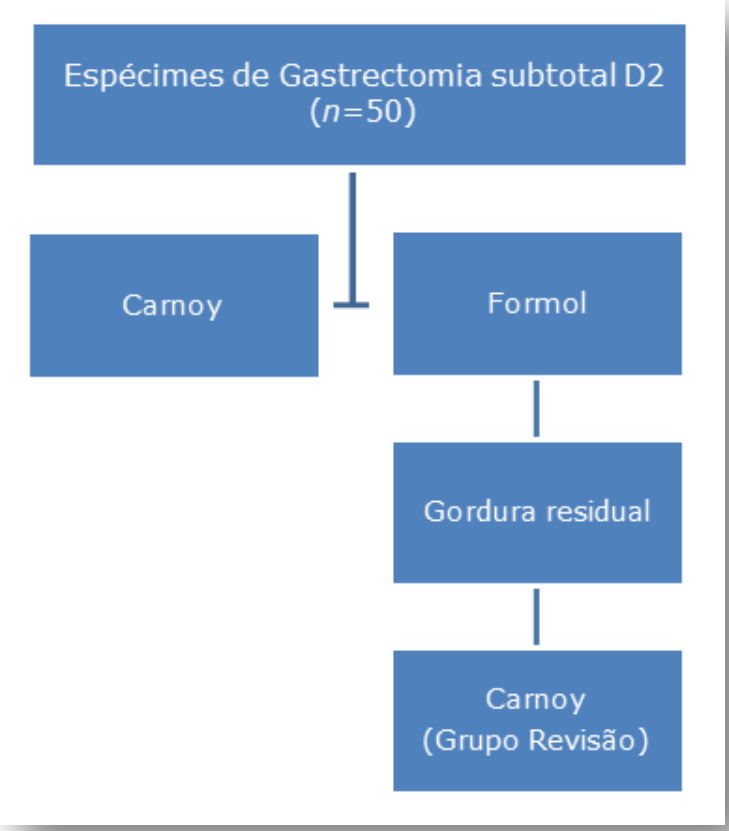


Figura 9 – Fluxograma com os braços do estudo

Os grupos foram denominados Carnoy, Formol, Revisão (gordura residual do grupo Formol imersa em Carnoy) e Formol+Revisão (soma dos grupos Formol e Revisão).

A solução de Carnoy foi fornecida pelo Laboratório de Investigação Médica de número 50 (LIM-50) da FMUSP, enquanto a solução de formalina faz parte da rotina do ICESP. O preço de ambas soluções foi levantado em quatro fornecedores distintos, antes e após o fim do estudo. O menor custo para cada solução foi utilizado para comparação.

Os critérios de inclusão e exclusão para o estudo se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 – Critérios de inclusão e exclusão do estudo.

Critérios de inclusão
Adenocarcinoma gástrico
Gastrectomia subtotal
Linfadenectomia D2
Paciente lúcido e capaz de compreender o protocolo de estudo
Critérios de exclusão
Estádio IV (metástases a distância)
Cirurgias prévias sobre o estômago e/ou epíplon
T4b e/ou ressecções multiviscerais
Neoadjuvância para a lesão gástrica
Radioterapia prévia em andar superior do abdome

3.2. Análise patológica

3.2.1. Avaliação macroscópica

Após a fixação, o estômago foi aberto ao longo da grande curvatura (exceto quando esta se encontrava comprometida pela lesão), expondo-se a mucosa e registrando-se as seguintes dimensões: comprimento ao longo das curvaturas gástricas, largura, espessura, tamanho das margens e comprimento do duodeno. A lesão tumoral foi avaliada em relação às suas dimensões, aspecto, localização, classificação de Borrmann e margens de ressecção. As margens e a serosa adjacente à lesão foram marcadas com tinta nanquim e representadas através de cortes perpendiculares. Secções do centro e da periferia do tumor também foram realizadas para avaliar a profundidade de invasão e a transição com a mucosa gástrica normal. As diferentes regiões do estômago também foram representadas para avaliação histológica, assim como eventuais úlceras ou áreas suspeitas para displasia.[85]

É necessário destacar que nos tumores onde havia extensão direta da doença para a gordura perigástrica, esta foi preservada junto ao estômago durante a dissecção a fresco, de modo a não haver violação da serosa mudando o estádio da lesão, que passaria de T3 para T4a com margem não avaliável.

O epíplon e as cadeias linfonodais, ambos enviados em separado, foram dissecados em busca de linfonodos através de visualização, palpação e secção. Toda estrutura nodular encontrada foi incluída em sua totalidade para análise histológica. Linfonodos maiores que 5mm foram fatiados ao meio (ou em mais fatias quando possível), sendo todas as secções submetidas a análise. As estruturas

menores que 5mm não foram seccionadas, sendo incluídas em cassetes histológicos por inteiro.[86]

3.2.2. Processamento, inclusão e cortes histológicos

Após a fixação e avaliação macroscópica, o material foi processado em sistema automatizado (Zeiss, STP 420D, Thermo Scientific), onde passou por banhos sucessivos de álcool a 100% (desidratação), xilol (diafanização) e parafina (impregnação). Ao término do processamento, os cassetes foram retirados do histotécnico e transferidos para um recipiente de parafina líquida. Estes foram submetidos à inclusão em blocos de parafina e permaneceram no freezer (-15ºC a -25ºC) por 20 minutos. Os blocos foram então submetidos a cortes histológicos em micrótomos convencionais, com espessuras de 3 a 4 µm (microtomia). As fitas de parafina com todo o material do bloco foram colocadas em banho-maria para a abertura do corte. Em seguida, transferiu-se a fita do banho para uma lâmina histológica, onde foram colocadas em estufa (60°C a 80°C) para melhor adesão/fixação do corte à lâmina, com posterior retirada da parafina por aproximadamente 20 minutos.[86, 87]

3.2.3. Coloração e montagem

As lâminas foram coradas pelo método da H&E, em equipamento automático (HMS 740, Thermo Scientific). Os núcleos, corados pela hematoxilina, são evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares, corados pela Eosina, são visualizados em rosa. No equipamento, as lâminas foram submetidas aos seguintes banhos: xilol (4 banhos de 1 minuto), álcool absoluto (4 banhos de 20 segundos), água (1 minuto), hematoxilina de Harris

(4 minutos), água (1 minuto), eosina (15 segundos), álcool absoluto (6 banhos de 20 segundos), xilol (5 banhos de 30 segundos). A seguir, as lâminas foram montadas em equipamento automatizado (CTM 6, Thermo Scientific).[86, 87]

3.2.4. Avaliação microscópica

As lâminas foram avaliadas por patologista em microscópio óptico convencional, sendo determinadas as seguintes variáveis patológicas, conforme o protocolo interno do serviço:

1- Tipo histológico segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS): adenocarcinoma tubular, adenocarcinoma papilífero, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma tipo pouco coesivo (incluindo carcinoma com células em anel de sinete), tipos mistos.[88]

2- Tipo histológico conforme a classificação de Lauren: intestinal ou difuso.[89]

3- Tipo histológico conforme a classificação de Ming: expansivos ou infiltrativos.[90]

4- Ausência ou presença de: infiltração perineural, invasão venosa e invasão linfática.[85]

5- Infiltrado inflamatório peritumoral: se leve, moderado ou acentuado.[85]

6- Reação estromal desmoplásica: se ausente, leve, moderada ou acentuada.[85]

7 - Nível de invasão na parede gástrica: pT (7ª TNM).[12]

8- Metástases linfonodais: pN (7ª TNM).[12]

9- Metástases à distância: pM (7ª TNM).[12]

10- Estádio patológico: pTNM (7ª TNM).[12]

3.2.5. Coleta dos dados patológicos

Todas as peças incluídas no estudo foram dissecadas e processadas pela mesma biomédica (assistente técnica em patologia). A avaliação histológica e o relatório anatomopatológico ficaram a cargo de diferentes patologistas do ICESP. Todas as estruturas nodulares identificadas na macroscopia foram analisadas microscopicamente de modo a confirmá-las ou não como linfonodos. Adicionalmente, após a divulgação do laudo final pelo patologista, todos os linfonodos foram recontados através de microscopia óptica para se evitar eventuais erros de contagem. Esta etapa foi realizada pela mesma biomédica encarregada da dissecção. Ela também foi responsável pela coleta dos seguintes dados: data e horário em que a peça foi retirada da solução fixadora, tempo utilizado para a dissecção linfonodal (cronometrado em minutos, a partir da retirada da peça da solução fixadora, até o término da dissecção), número e tamanho dos linfonodos encontrados, estadiamento, entre outros (Anexo P, página 62).

3.3. Análise retrospectiva

Para avaliar a influência da implementação de protocolo de estudo sobre o número de linfonodos encontrados, foram avaliados os dados das gastrectomias subtotais com linfadenectomia D2, realizadas no ICESP previamente ao início do estudo. Os mesmos critérios de inclusão e exclusão da análise prospectiva foram utilizados para a seleção dos casos retrospectivos. Adicionalmente, foram excluídos casos cuja descrição cirúrgica não deixava claro a extensão da linfadenectomia. Os 25 casos mais recentes que se enquadraram nestes critérios foram incluídos na análise.

Este grupo foi denominado Retrospectivo e os dados coletados foram: nome, registro no HCFMUSP, idade, sexo, IMC, diagnóstico, cirurgias abdominais prévias, tratamentos oncológicos prévios, localização da lesão, data e detalhes da cirurgia realizada, número total de linfonodos encontrados, número de linfonodos com metástases e o estádio patológico.

Todos estes casos foram submetidos ao protocolo habitual de fixação em formalina por 24 a 48 horas, com posterior dissecção linfonodal.

3.4. Análise estatística

Um banco de dados *online*, com todas as informações coletadas, foi criado e mantido pelo autor principal, o qual foi o único com acesso a estes dados.

A lista de randomização, o cálculo do tamanho da amostra e a análise estatística dos resultados foram realizados pela empresa *PGS medical statistics*.

A randomização foi gerada por computador através do programa SAS® Enterprise Guide® versão 4.3.

Como não havia estudo similar a este na literatura, optou-se por realizar um estudo piloto com 20 casos visando determinar qual seria o tamanho da amostra. Neste piloto, a diferença encontrada entre os grupos Carnoy e Formol quanto ao número de linfonodos foi de 14,4 (favorecendo o grupo Carnoy) e para esta ser considerada estatisticamente significativa, assumindo o maior desvio padrão encontrado (16,3) e poder de 80%, seriam necessários 21 pacientes em cada um dos grupos. Optou-se por incluir 50 casos no estudo para aumentar o poder estatístico. Como não houve modificação na

metodologia utilizada, os casos do grupo piloto foram incluídos no estudo.

Na análise dos resultados, ao comparar os grupos quanto às variáveis que apresentam uma distribuição aproximadamente normal, ou ao menos homogeneidade entre as variâncias (exemplos: idade, IMC e tempo), foi utilizado o teste t de Student. Para comparar os grupos quanto ao número de linfonodos (que não apresenta distribuição normal) foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparar a homogeneidade dos grupos em relação ao sexo e ao estádio patológico. Um modelo linear generalizado com distribuição binomial negativa foi utilizado para avaliar a influência das variáveis idade, sexo e IMC sobre o número de linfonodos. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar se houve influência do IMC sobre o tempo necessário para a dissecção linfonodal. O *p* foi considerado significativo quando inferior a 0,05.[91]

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Como a inclusão no estudo só ocorreu após a retirada da peça, nenhum caso foi perdido. Os casos incluídos e os respectivos dados coletados podem ser visualizados nas Tabelas 10 a 12 (páginas 63 a 65).

4.1. Homogeneidade dos grupos

Os grupos Formol e Carnoy foram homogêneos em relação à idade, IMC e sexo (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparação entre os grupos Carnoy e Formol.

	GRUPO		**Valor *p***
	Carnoy	**Formol**	
Idade (anos)			
Média ± DP	65,3 ± 12,3	65,9 ± 9	
Mediana	67,0	66,0	*p*1=0,855
Amplitude	43 - 84	42 - 82	
Total de pacientes	25	25	
IMC			
Média ± DP	25,4 ± 4,9	25 ± 5,2	
Mediana	25,7	24,1	*p*1=0,570
Amplitude	16,8 - 40	16,7 - 40	
Total de pacientes	25	25	
Sexo - *n* (%)			
Feminino	15 (60%)	13 (52%)	*p*2=0,776
Masculino	10 (40%)	12 (48%)	
Total de pacientes	25	25	

*p*1: Teste t de Student

*p*2: Teste Qui-quadrado

4.2. Duração da dissecção linfonodal

Na Tabela 14 visualiza-se a duração da dissecção linfonodal. O tempo médio para o Carnoy e Formol foi de 44 e 49 minutos, respectivamente (p=0,114). A dissecção da gordura residual necessitou de aproximadamente 29 minutos adicionais. O grupo Formol+Revisão apresentou uma média de tempo de aproximadamente 78 minutos. A diferença de tempo deste grupo para o Carnoy foi estatisticamente significativa (p<0,001).

Tabela 14 – Tempo utilizado na dissecção linfonodal.

	GRUPO				**Valor *p***
	Carnoy	**Formol**	**Revisão**	**Formol + Revisão**	
Tempo (min)					
Média ± DP	44,4 ± 9,7	49,2 ± 11	28,7 ± 6,7	77,9 ± 16,3	$p1$=0,114
Mediana	40,0	50,0	30,0	80,0	$p2$<0,001
Amplitude	30 - 60	30 - 63	15 - 40	45 - 100	
Total de pacientes	25	25	25	25	

$p1$: Teste t de Student entre os grupos Carnoy e Formol .

$p2$: Teste t de Student entre os grupos Carnoy e Formol+Revisão

4.3. Número de linfonodos encontrados

A média de linfonodos encontrados nos grupos Carnoy e Formol foi de 50,4 e 34,8; respectivamente (p<0,001). Já a média do grupo Revisão foi de 16,9; enquanto a do grupo Formol+Revisão foi de 51,7 linfonodos, sendo similar ao grupo Carnoy (p=0,809).

Tabela 15 – Número de linfonodos encontrados.

	GRUPO				
	Carnoy	**Formol**	**Revisão**	**Formol + Revisão**	**Valor *p***
Número de linfonodos					
Média ± DP	50,4±14,5	34,8±12,8	16,9±10,3	51,7±17,2	$p1$<0,001
Mediana	49,0	30,0	17,0	50,0	$p2$=0,809
Amplitude	25 - 79	17 - 70	1 - 47	22 - 95	
Total de pacientes	25	25	25	25	

$p1$: Teste de Mann-Whitney entre os grupos Carnoy e Formol.

$p2$: Teste de Mann-Whitney entre os grupos Carnoy e Formol+Revisão

4.4. Linfonodos no grupo Revisão

Foram encontrados linfonodos em todos os casos do grupo Revisão (variação de 1-47). Em relação ao tamanho, com exceção de 1 linfonodo de 7mm, todos os demais 421 gânglios linfáticos encontrados mediam ≤3mm no maior eixo. Em oito (32%) pacientes, linfonodos metastáticos foram encontrados, fato que determinou mudança no estádio patológico de 2 (8%) deles, conforme se observa na Tabela 16 (página 32). Os 13 linfonodos comprometidos pela neoplasia encontrados neste grupo eram ≤3mm.

Tabela 16 – Casos do grupo Formol com linfonodos metastáticos sendo perdidos e estádio patológico antes e após a revisão da gordura residual com Carnoy.

Caso	Formol*	7ª TNM	Revisão*	Formol+Revisão*	7ª TNM
4	9+/58	N3 (IIIC)	3+/21	12+/79	N3 (IIIC)
6	8+/52	N3 (IIIB)	3+/21	11+/73	N3 (IIIB)
8	4+/30	N2 (IIIB)	1+/14	5+/44	N2 (IIIB)
9	2+/28	**N1 (IB)**	1+/26	3+/54	**N2 (IIA)**
11	1+/46	N1 (IIIA)	1+/15	2+/61	N1 (IIIA)
14	6+/22	**N2 (IIA)**	2+/11	8+/33	**N3 (IIB)**
17	9+/28	N3 (IIIB)	1+/17	10+/45	N3 (IIIB)
19	8+/37	N3 (IIIB)	1+/28	9+/65	N3 (IIIB)

* Linfonodos positivos/Linfonodos totais

4.5. Linfonodos <5mm

Linfonodos <5mm (Tabela 17) foram mais frequentes no grupo Carnoy, em relação ao grupo Formol (média de 34 e 23 linfonodos, respectivamente; *p*=0,01).

Tabela 17 – Linfonodos <5mm encontrados nos grupos Carnoy e Formol.

	GRUPO		Valor *p*
	Carnoy	**Formol**	
Número de linfonodos < 5mm			
Média ± DP	34,0 ± 14,8	23,0 ± 11,2	
Mediana	35,0	21,0	*p*=0,01
Amplitude	13 - 66	6 - 54	
Total de pacientes	25	25	

p: Teste de Mann-Whitney entre os grupos Carnoy e Formol

4.6. Influência das variáveis sexo, idade e IMC

Não foi observada influência da idade, sexo ou IMC sobre o número de linfonodos encontrados (Tabela 18). Também não houve influência do IMC sobre o tempo necessário para a dissecção (Gráfico 3 e Tabela 19, páginas 33 e 34). Para estes cálculos, os grupos Carnoy e Formol+Revisão foram considerados como um único grupo.

Tabela 18 – Idade, sexo e IMC como preditores independentes do número de linfonodos encontrados.

	Coeficiente	**Intervalo de confiança (95%)**	**Valor *p***
Variáveis			
Idade (anos)	-0,001	[-0,01; 0,01]	*p*=0,784
Sexo (F vs M)	-0,030	[-0,2; 0,14]	*p*=0,732
IMC	0,012	[0; 0,03]	*p*=0,135

p: Modelo linear generalizado com distribuição de binomial negativa - modelo simples

Número de observações usadas em cada modelo = 50

Gráfico 3 – Tempo de dissecção e IMC.

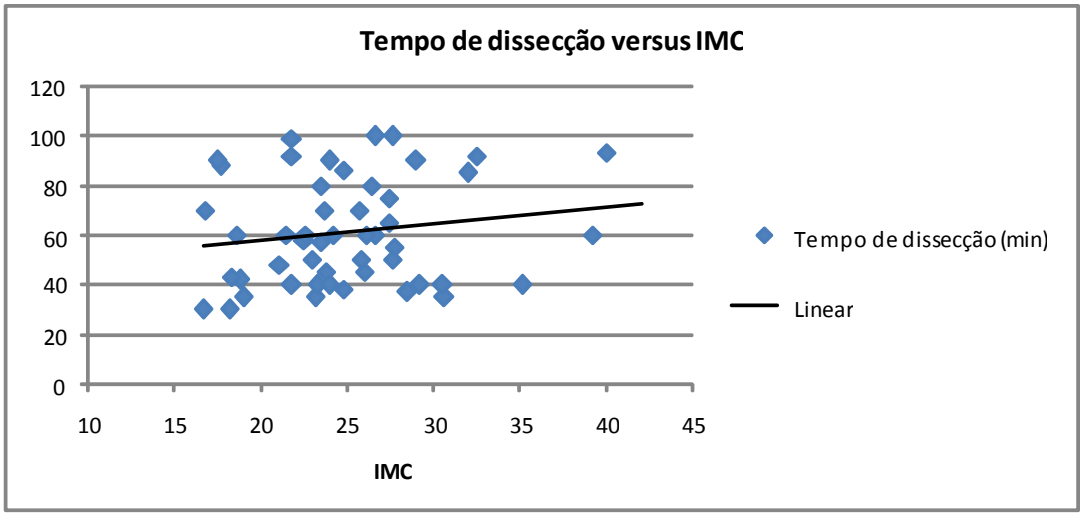


Tabela 19 – Tempo de dissecção por faixas do IMC.

	IMC					Valor *p*
	<25	**25 a 29,9**	**30 a 34,9**	**35 a 39,9**	**≥40**	
Tempo de dissecção (min)						
Média ± DP	58,4±21,2	65,1±20,4	63,0±29,7	50,0±14,1	93,0±0	
Mediana	57,5	60,0	62,5	50,0	93,0	*p*=0,692
Amplitude	30 - 99	37 - 100	35 - 92	40 - 60	93 - 93	
Total de pacientes	28	15	4	2	1	

p: Teste de Kruskal-Wallis

4.7. Estádio clínico

O estádio clínico patológico foi similar entre os grupos Carnoy e Formol+Revisão (poder de 22% para a amostra estudada).

Tabela 20 – Estádio clínico para os grupos Carnoy e Formol+Revisão (7ª TNM).

	GRUPO		Valor *p*
	Carnoy	**Formol+Revisão**	
Estádio clínico			
0	1	0	
I	12	9	*p*=0,438
II	5	5	
III	7	11	
Total de pacientes	25	25	

p: Teste Qui-quadrado

4.8. Análise retrospectiva

Os dados retrospectivos coletados se encontram expostos na Tabela 12 (página 65). Os grupos Formol e Retrospectivo foram

homogêneos com relação à idade, sexo, IMC e estádio clínico (Tabela 21). O poder da amostra para a análise do estádio clínico foi de 41%. O número de linfonodos foi equivalente: 34,8 e 34,5 para os grupos Formol e Retrospectivo, respectivamente (p>0,05).

Tabela 21 – Análise descritiva e comparação entre os grupos Formol e Retrospectivo.

	GRUPO		**Valor *p***
	Formol	**Retrospectivo**	
Idade (anos)			
Média ± DP	65,9 ± 9	65,5 ± 11,6	
Mediana	66,0	69,0	*p*1=0,903
Amplitude	42 - 82	41 - 82	
Total de pacientes	25	25	
IMC			
Média ± DP	25,4 ± 4,9	25,3 ± 5,4	
Mediana	25,7	25,1	*p*1=0,946
Amplitude	16,8 - 40	15,2 – 37,7	
Total de pacientes	25	25	
Sexo - n (%)			
Feminino	13 (52%)	15 (60%)	*p*2=0,776
Masculino	12 (48%)	10 (40%)	
Total de pacientes	25	25	
Número de linfonodos totais			
Média ± DP	34,8 ± 12,8	34,5 ± 12,3	
Mediana	30,0	35,0	*p*3=0,802
Amplitude	17 - 70	14 - 55	
Total de pacientes	25	25	
Estádio clínico (7ª TNM)			
I	10	17	
II	4	2	*p*2=0,135
III	11	6	
Total de pacientes	25	25	

*p*1: Teste t de Student

*p*2: Teste Qui-quadrado

*p*3: Teste de Mann-Whitney

4.9. Custo financeiro

O valor das soluções permaneceu estável ao longo dos 19 meses do estudo. Em março de 2014, o custo para um litro de formalina e de Carnoy era R$12,80 e R$18,26; respectivamente. Os valores individuais estão expostos na Tabela 22 e não foi considerado no preço final da solução de Carnoy o custo da mão de obra para misturar os reagentes, caso estes sejam comprados separadamente.

Como um litro de solução permite a análise de aproximadamente 2 peças no serviço de Patologia do ICESP, utilizar a solução de Carnoy trouxe um custo adicional de R$ 2,73 por peça analisada.

Tabela 22 – Preço em reais para 1 litro de solução em 26/3/2014.

Solução	Preço/litro
Formalina neutra tamponada 10%	R$12,80
Etanol absoluto (E)	R$15,00
Clorofórmio (C)	R$24,20
Ácido acético glacial (A)	R$20,00
Carnoy (0,6E+0,3C+0,1A)	R$18,26

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O câncer gástrico é uma doença frequente e agressiva, cuja sobrevida dos doentes se correlaciona fortemente com o estádio linfonodal.[4, 6-11, 17-19] O tratamento desta moléstia é geralmente cirúrgico e permite controlar a doença loco-regional, além de fornecer material para a categorização dos pacientes em grupos com prognóstico e conduta distintos.[92] Pacientes com poucos linfonodos examinados em seu espécime cirúrgico apresentam prognóstico pior em relação àqueles do mesmo estádio, mas que tiveram mais linfonodos encontrados.[30, 33, 34] A principal justificativa para este achado é o sub-estadiamento dos doentes com poucos gânglios linfáticos examinados (linfadenectomia insuficiente ou análise patológica ineficaz).[29, 34, 36, 47, 48, 93] Independentemente do motivo, classificar um paciente erroneamente pode reduzir sua sobrevida ao não se indicar terapia adjuvante, por exemplo.[16, 92]

Com a padronização da cirurgia e sua realização por equipe treinada, se garante que a linfadenectomia é adequada e recai sobre a equipe da anatomia patológica a responsabilidade de encontrar os linfonodos retirados. Entretanto, esta análise é tecnicamente exigente e linfonodos pequenos podem passar despercebidos, mesmo de pessoas dedicadas.[29] Este fato seria clinicamente irrelevante se apenas linfonodos grandes contivessem metástases, mas mesmo micrometástases (0,2-2mm) impactam negativamente sobre a sobrevida.[46-48]. Noda et al.[50] revisaram histologicamente 23.233 linfonodos e observaram que se todos aqueles ≤5mm fossem desprezados, 37,8% de todos os gânglios linfáticos metastáticos seriam perdidos e um número expressivo de pacientes seria sub-

estadiado (15% e 4% se fossem ignorados os linfonodos menores que 6mm e 4mm, respectivamente).

O intuito de utilizar soluções clareadores de gordura, ou reveladoras de linfonodos, é justamente facilitar o encontro desses gânglios linfáticos pequenos, permitindo sua posterior análise histológica. Entretanto, a literatura sobre o tema é muito limitada e não evidencia de modo inequívoco que há benefício clínico do uso destas soluções em pacientes com câncer gástrico.[41-44]

Candela et al.[41] estudaram o espécime cirúrgico de 11 pacientes submetidos à gastrectomia com linfadenectomia (D2 ou D3) por adenocarcinoma. As peças foram dissecadas a fresco por residente do serviço de patologia, que por sua vez permaneceu sem conhecimento do estudo. Posteriormente, a gordura residual foi imersa em álcool por 24 horas e dissecada novamente, desta vez por cirurgião, em busca de linfonodos perdidos. Em 5 dos 11 casos estudados havia linfonodos na gordura residual e em 2 casos houve mudança do estádio patológico graças à nova análise. A média±DP dos linfonodos encontrados foi de 17,7±9,8 e 18,5±11,8 para a dissecção a fresco e a da gordura residual, respectivamente. A média final de gânglios linfáticos obtidos por paciente foi de 36,3±17,5 e este incremento foi estatisticamente significativo ($p<0,01$). Os autores também notaram que o tamanho médio dos linfonodos encontrados na gordura residual era significativamente menor em relação aos da dissecção a fresco (2,96±0,84mm vs 4,06±0,95mm; $p<0,001$). É importante ressaltar que patologistas em treinamento realizaram a dissecção a fresco e que o número de linfonodos encontrado por estes foi abaixo do esperado para a linfadenectomia relatada. Além disso, os cirurgiões responsáveis pela dissecção da gordura residual estavam cientes do estudo.

Koren et al.[42] avaliaram dez espécimes em que menos de 10 linfonodos foram encontrados na dissecção a fresco. Todos estes eram de pacientes submetidos à gastrectomia com linfadenectomia (D1 ou D2) por adenocarcinoma. A gordura residual destes casos foi imersa por 6 a 12 horas em uma solução de etanol (65%), éter dietílico (20%), formalina (10%) e ácido acético glacial (5%) e então dissecada. De modo similar ao observado nesta tese, os autores notaram que após a fixação na solução os linfonodos se destacaram como nódulos pálidos em meio à gordura amarelada. A solução utilizada elevou o número de linfonodos encontrados e estes foram menores que os encontrados com a dissecção a fresco (ambas análises com $p<0,01$). Entretanto, é necessário atentar para o fato de que o número de linfonodos obtidos no estudo foi extremamente baixo: 3,0±4,13 a fresco e 12,2±5,16 no total. Dos 10 casos incluídos, 4 não tinham nenhum linfonodo identificado a fresco e 2 casos tinham apenas 1 linfonodo cada. Neste contexto, releva-se que houve mudança de estadiamento em 6 dos 10 casos (4 Nx para N0, 1 N1 para N2 e 1 N0 para N2).

Siqueira et al.[43] utilizaram a solução do artigo anterior no espécime de 13 pacientes submetidos a gastrectomia. Após a dissecção a fresco, a gordura residual foi imersa nessa solução por 6 horas, sendo então reavaliada. Os linfonodos obtidos com a solução apresentaram diâmetro menor em relação aos da dissecção a fresco. Também houve aumento significativo do número de linfonodos encontrados com o uso da solução (17,07 e 9,46 para a dissecção a fresco e a da gordura residual, respectivamente). Não houve mudança no estadiamento com o uso da solução. Neste estudo não fica clara a extensão da linfadenectomia e o número de pacientes incluídos foi pequeno.

Luebke et al.[44] utilizaram a mesma solução dos 2 estudos anteriores em 11 peças de gastrectomia D2 por adenocarcinoma. As peças foram dissecadas a fresco sendo encontrada média de 41,1 linfonodos por paciente. Após esta etapa, a gordura residual foi imersa na solução por 6 a 12 horas sendo reavaliada. A média de linfonodos obtidos com a solução foi de 12,5; este um aumento estatisticamente significativo ($p<0,0003$). Adicionalmente, em 3 dos 11 casos (27%) havia linfonodos metastáticos na gordura residual, achado similar ao desta tese (32%). Apesar desse achado, não houve alteração no estadiamento de nenhum dos pacientes incluídos no estudo. Os autores também observaram aumento significativo na detecção de linfonodos <3mm com a utilização da solução, fato também encontrado nesta tese.

É necessário frisar que a rotina em relação ao produto da gastrectomia no ICESP consiste em dissecar a gordura em busca dos linfonodos após a fixação química do espécime cirúrgico. Isso porque a JGCA recomenda dissecar a peça a fresco e o presente estudo poderia ser alvo de críticas por não seguir esta recomendação.[13] A justificativa para tanto é a de que não há diferença no número de linfonodos obtidos em nossa instituição (Serviço de Cirurgia do Estômago do HCFMUSP) entre as duas opções.[11, 36] Adicionalmente, o número de linfonodos encontrados com esta abordagem é satisfatório e similar ao de serviços internacionais de referência no tratamento do câncer gástrico.[94, 95] Ao manter a rotina do serviço também foi possível comparar os grupos Formol e Retrospectivo, verificando assim, a eventual influência da implementação de protocolo de pesquisa sobre o número de linfonodos encontrados, afinal em ambos a peça foi fixada em formalina com posterior dissecção.

A escolha por analisar a gordura residual do grupo Formol, que seria descartada, teve dois objetivos distintos: verificar se a análise

rotineira perde linfonodos ressecados e não infringir a ética, afinal a expectativa do estudo era a de que mais linfonodos fossem encontrados com a solução de Carnoy e, se confirmada essa hipótese, os pacientes do braço Formol seriam prejudicados em relação aos do braço Carnoy.

A respeito dos resultados do estudo, o tempo dedicado à dissecção foi similar para ambas soluções (ao redor de 40-50 minutos por peça). Entretanto, o Carnoy permitiu encontrar mais linfonodos no mesmo tempo, fato que sugere que esta solução torna mais ágil a dissecção.

A solução de Carnoy também se revelou superior à de formalina em relação ao número de linfonodos encontrados (50,4±14,5 vs 34,8±12,8; $p<0,001$). Também é interessante notar que o número de linfonodos do grupo Formol+Revisão foi estatisticamente similar ao do grupo Carnoy (51,7±17,2; $p=0,809$). Para melhor interpretar este fato devemos olhar detalhadamente para o tamanho dos linfonodos encontrados no estudo. O número de linfonodos <5mm foi significativamente maior no grupo Carnoy, em relação ao grupo Formol. Adicionalmente, com exceção de um gânglio linfático de 7mm, todos os demais linfonodos do grupo Revisão eram ≤3mm. Desse modo, o Carnoy facilita a identificação de linfonodos muito pequenos, que são justamente os gânglios linfáticos perdidos com o uso da solução de formalina e que foram encontrados na gordura residual ao se utilizar o Carnoy. Em relação ao linfonodo de 7mm do grupo Revisão, provavelmente houve falha na avaliação e uma estrutura maior acabou passando despercebido.

As Figuras 10 a 13 (páginas 43 e 44) demonstram a capacidade do Carnoy de destacar os linfonodos. A Figura 12 apresenta um comparativo entre as soluções, demonstrando a maior facilidade de identificar linfonodos milimétricos após a fixação em Carnoy.

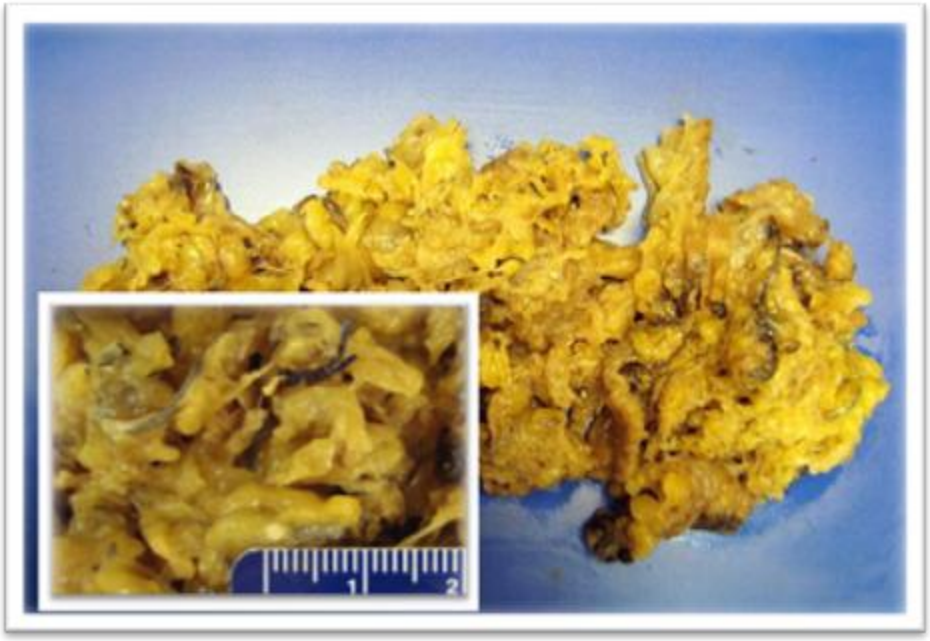


Figura 10 – Linfonodo milimétrico em meio ao epíplon fixado em Carnoy

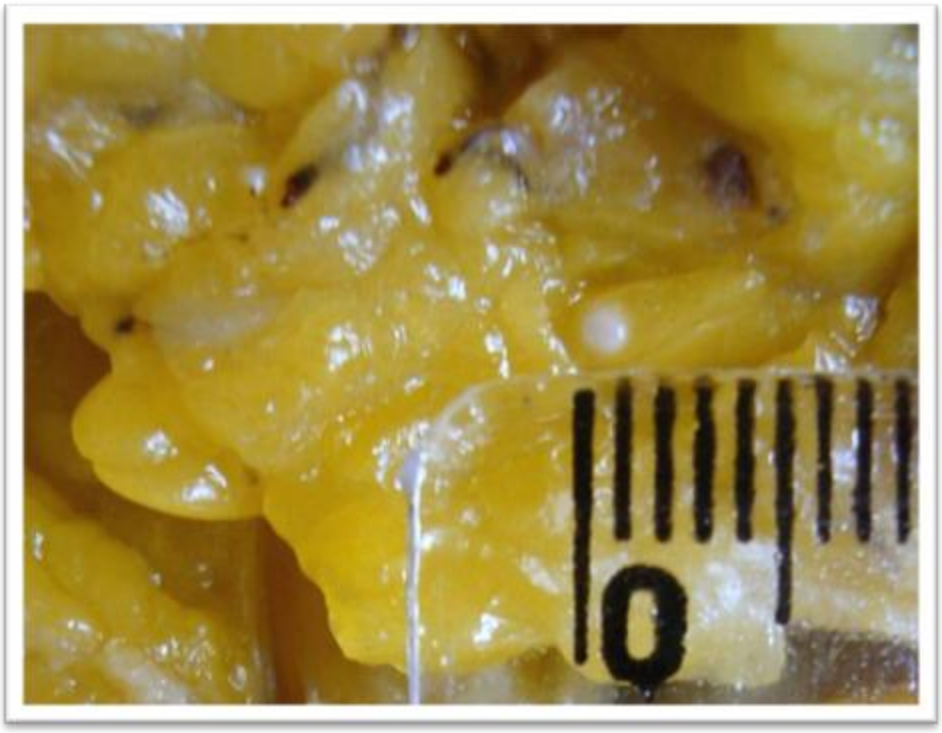


Figura 11 – Destaque para linfonodo milimétrico em meio à gordura amarelada, fixação em Carnoy

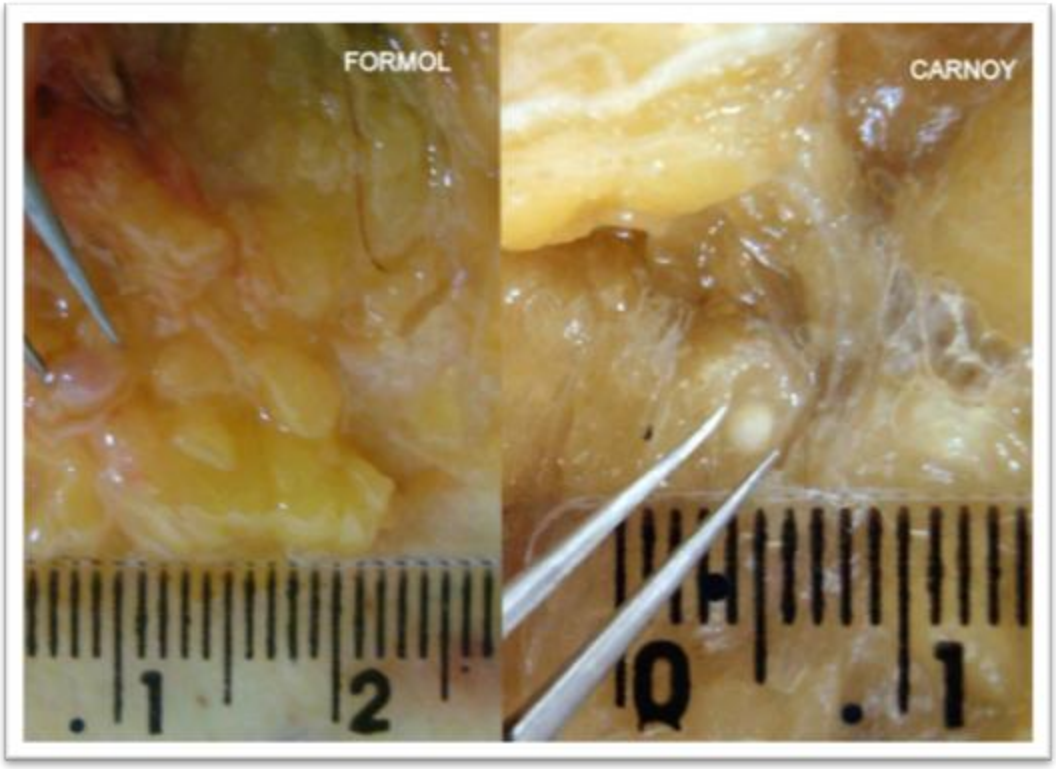


Figura 12 – Comparação entre grupos Formol e Carnoy na identificação de linfonodos milimétricos

Figura 13 – Facilidade de identificação do linfonodo durante secção de cadeia gástrica fixada em Carnoy

A análise do grupo Revisão revelou que linfonodos sempre foram perdidos com a fixação e dissecção rotineiras. Do total de 422 linfonodos encontrados, 13 deles eram metastáticos (Figuras 14 e 15, páginas 45 e 46). Em relação à relevância deste fato, 32% dos pacientes do braço Formol (8 dos 25) tinham linfonodos metastáticos ressecados sendo descartados sem análise histológica e a revisão da gordura a ser desprezada permitiu que 2 (8%) deles migrassem para um estádio patológico mais elevado. Este evento alterou o prognóstico destes 2 pacientes, entretanto não modificou a conduta clínica, pois ambos possuíam linfonodos positivos antes da revisão e já seriam indicados para adjuvância.

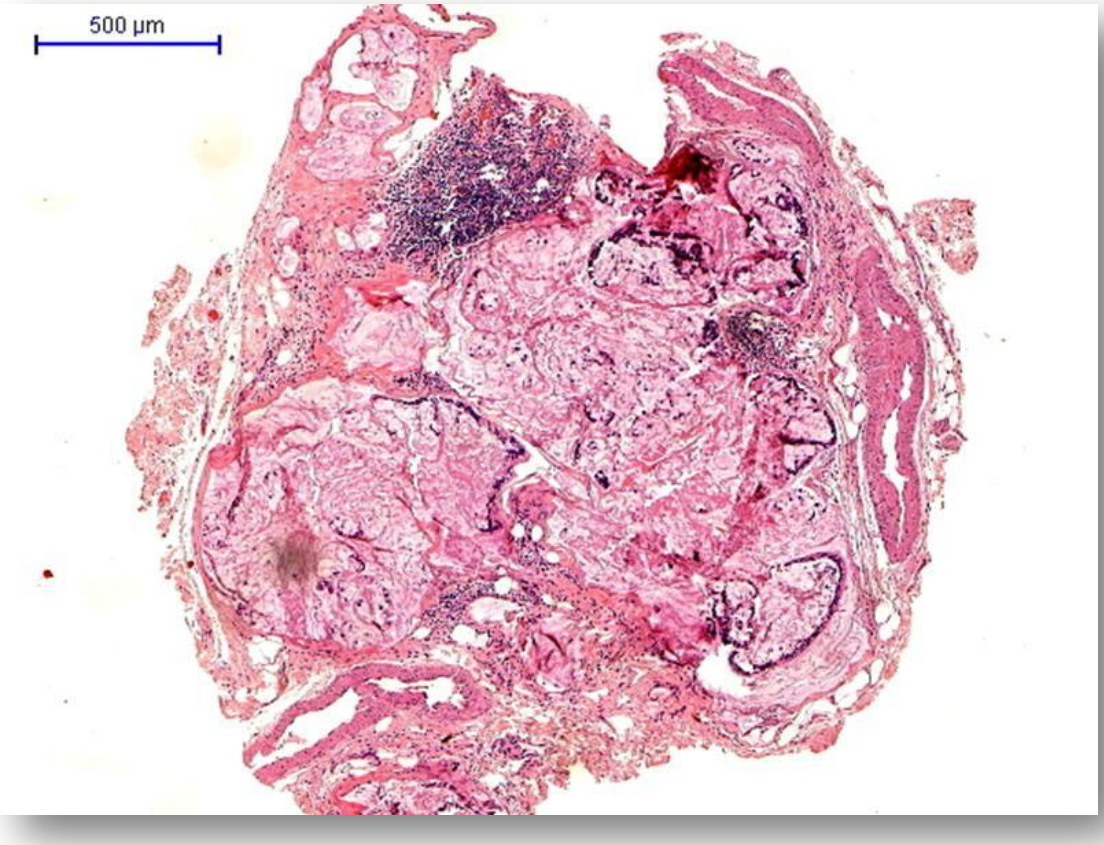


Figura 14: Linfonodo milimétrico metastático (grupo Revisão)

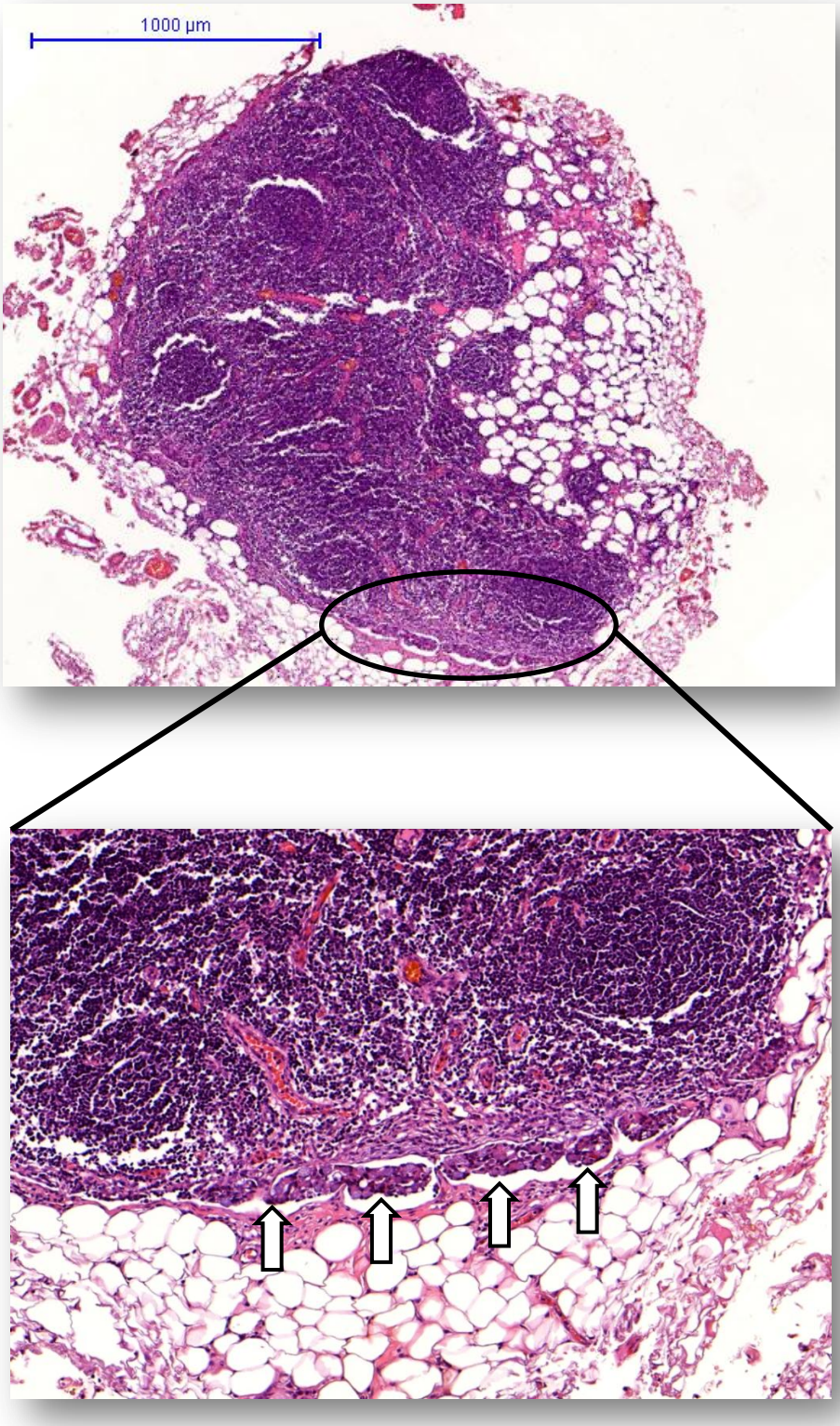


Figura 15 – Linfonodo do grupo Revisão com micrometástases (destaque para o depósito tumoral maior, de 895 µm)

Na presente amostra, a idade, o sexo e o IMC não influenciaram no número de linfonodos encontrados. Também não houve correlação entre o IMC e a duração da dissecção.

Os grupos Carnoy e Formol+Revisão foram similares em relação ao estádio clínico patológico. Entretanto, é necessário destacar que o poder da amostra é pequeno para detectar diferença entre os resultados (poder de 22%). O mesmo é válido para os grupos Formol e Retrospectivo (poder de 41%).

A análise retrospectiva foi incluída como grupo controle em relação ao grupo Formol. Assim, uma maior (ou menor) dedicação da pessoa envolvida na dissecção da peça neste braço do estudo poderia ser notada. Os grupos Formol e Retrospectivo foram similares entre si e não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de linfonodos encontrados. Desse modo, não houve influência da implementação de protocolo de pesquisa sobre o número de gânglios linfáticos obtidos no grupo Formol. Também se deve destacar que diferentes pessoas (biomédicos e médicos residentes) dissecaram as peças do grupo Retrospectivo e ao se encontrar o mesmo número de gânglios linfáticos no grupo Formol fica fortalecida a validade externa do estudo.

A respeito do custo financeiro das soluções, o Carnoy adiciona R$2,73 por peça analisada. Entretanto, para obter a mesma acurácia de estadiamento, a peça fixada em formalina precisaria ser imersa em Carnoy e posteriormente reavaliada, o que requer além do custo da formalina, o da solução de Carnoy e de mais 30 minutos de mão de obra (mediana do tempo de dissecção do grupo Revisão).

Em relação ao risco de viés, várias medidas foram tomadas visando garantir a validação interna do estudo. Os grupos foram distribuídos de modo aleatório, sendo homogêneos entre si. A

pesquisa foi conduzida em centro especializado, com cirurgiões altamente treinados neste tipo de procedimento e que permaneceram alheios quanto à randomização. Apenas produtos de gastrectomia subtotal com linfadenectomia D2 foram incluídos, evitando-se assim variáveis de confusão em relação à ressecção como: gastrectomia total ou subtotal, linfadenectomia D1 ou D2, esplenectomia associada ou não, ressecção de órgãos adjacentes ou não. Casos submetidos a neoadjuvância ou radioterapia prévia em andar superior do abdome também foram excluídos, uma vez que dados do câncer de reto demonstram que menos linfonodos são encontrados na peça cirúrgica após estas terapias.[96] Uma única pessoa ficou encarregada da dissecção da peça, uniformizando esta etapa. O fato de que o tempo utilizado na dissecção dos grupos Formol e Carnoy foi similar sugere que houve o mesmo grau de dedicação nos dois braços do estudo. Após a liberação do laudo final, as lâminas de todos os casos foram revisadas sob microscopia óptica, o que permitiu verificar o real número de linfonodos em cada peça (nem sempre os nódulos encontrados na macroscopia eram linfonodos) e evitou eventuais erros de contagem. Em relação ao grupo Retrospectivo, os mesmos critérios de inclusão e exclusão do grupo Formol foram utilizados. Além disso, a rotina do serviço foi mantida neste último.

Dentre as limitações do estudo, este foi unicêntrico e o número de pacientes incluídos foi relativamente pequeno. É possível que com uma amostra maior, casos N0 do braço Formol migrassem para N+, o que determinaria mudança na conduta clínica pós-operatória (com indicação de adjuvância), aumentando a relevância clínica do estudo. A dissecção a fresco não foi comparada com os métodos analisados e como o Carnoy tem odor característico, não foi possível esconder a randomização da responsável pela dissecção. A não avaliação da gordura residual do grupo Carnoy poderia ser uma limitação, mas ao

se obter estatisticamente o mesmo número de linfonodos nos grupos Carnoy e Formol+Revisão este fato se tornou pouco relevante.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Quando comparada à formalina, a solução de Carnoy permite encontrar número maior de linfonodos no espécime cirúrgico de gastrectomias com linfadenectomia.

Não houve diferença no tempo necessário para a dissecção linfonodal quando comparadas as duas soluções.

O Carnoy possibilitou encontrar linfonodos de tamanho menor em relação àqueles obtidos com a formalina.

Todos os casos submetidos à fixação e dissecção rotineiras tiveram linfonodos ressecados sendo ignorados. Este evento foi clinicamente relevante, pois linfonodos metástaticos estavam sendo perdidos em 32% dos casos e em 8% dos pacientes este fato determinou mudança do estádio clínico e do prognóstico.

Por fim, a implementação de protocolo de pesquisa não influenciou o número de linfonodos encontrados.

ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo A: Tabela 1 – Definição das categorias T, segundo a 7ª edição TNM.[12]

T	Tumor primário
TX	Não pode ser avaliado
T0	Sem evidências de tumor
Tis	Carcinoma in situ; tumor intra-epitelial sem invasão da lâmina própria
T1a	Tumor invade a lâmina própria ou muscular mucosa
T1b	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade muscular própria
T3	Tumor penetra no tecido subseroso, sem invasão do peritônio visceral ou estruturas adjacentes. Tumores com extensão para os ligamentos gastrocólico ou gastrohepático, ou para o pequeno e grande omento, sem perfuração do peritônio visceral também se incluem nesta categoria
T4a	Tumor invade peritônio visceral
T4b	Tumor invade estruturas adjacentes

Anexo B: Tabela 2 – Definição das categorias N, segundo a 7ª edição TNM.[12]

N	Linfonodos regionais
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases linfonodais
N1	Metástases em 1 a 2 linfonodos
N2	Metástases em 3 a 6 linfonodos
N3a	Metástases em 7 a 15 linfonodos
N3b	Metástases em mais de 15 linfonodos

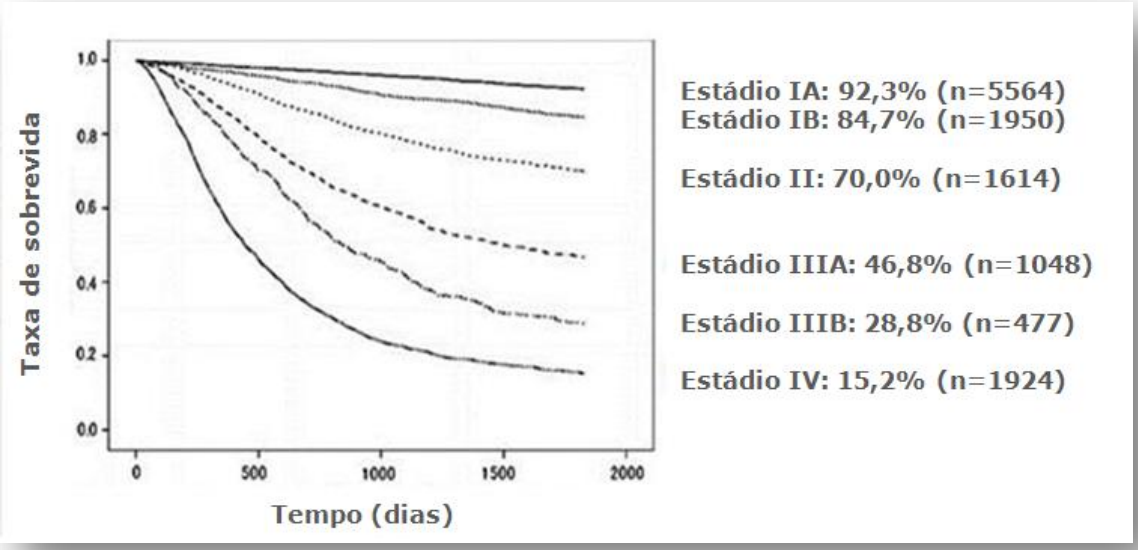
Anexo C: Tabela 3 – Definição das categorias M, segundo a 7ª edição TNM.[12]

M	Metástases a distância
MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases a distância
M1	Presença de metástases a distância

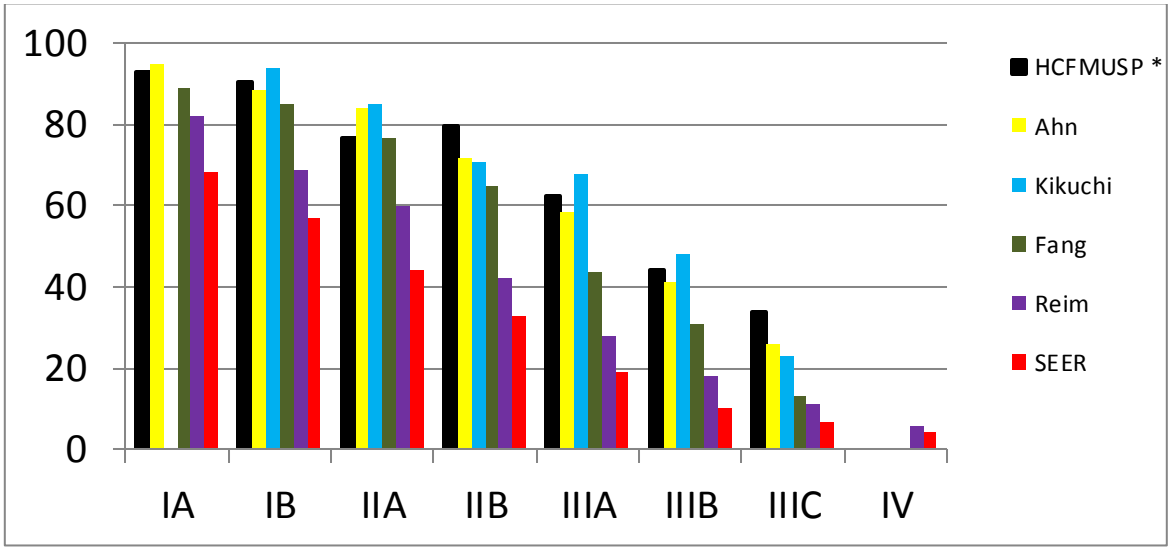
Anexo D: Tabela 4 – Grupos de Estádio/Prognóstico, segundo a 7ª edição TNM.[12]

Estádio clínico	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
IIIB	T4b	N0 ou N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
IIIC	T4b	N2 ou N3	M0
	T4a	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Anexo E: Gráfico 1 – Taxa de sobrevida global em 5 anos conforme estádio clínico de 13.002 pacientes com câncer gástrico tratados em 2002 no Japão (5ª edição TNM). Reproduzido sob autorização.[4]

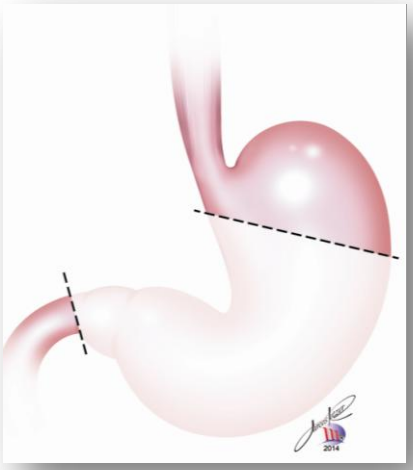


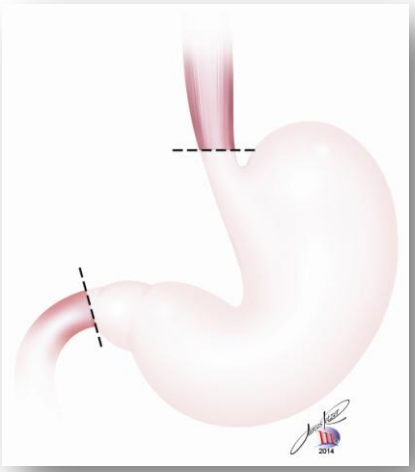
Anexo F: Gráfico 2 – Sobrevida global em 5 anos de pacientes com câncer gástrico segundo diferentes casuísticas (7ª edição TNM).[6-10]



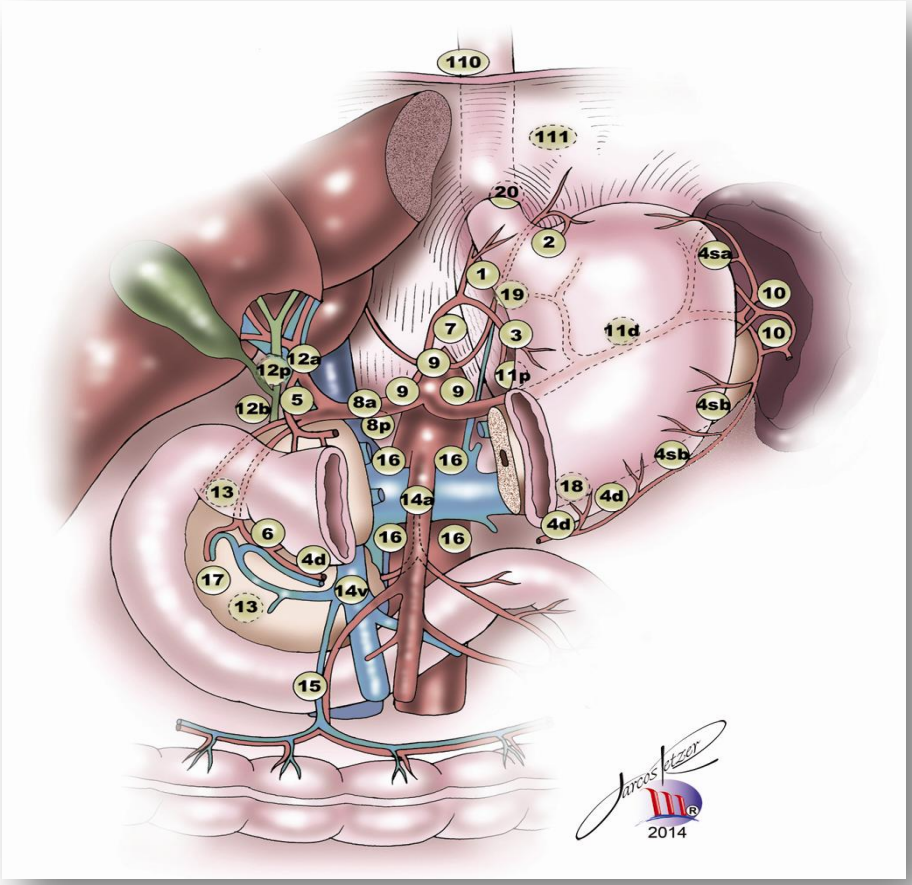
* Serviço de Cirurgia do Estômago do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Comunicação pessoal por Yagi OK.

Anexo G: Figura 1 – Gastrectomia subtotal e total.





Anexo H: Figura 2 – Localização anatômica das cadeias linfonodais gástricas (adaptado da JGCA).[13]



Anexo I: Tabela 5 – Definição anatômica das cadeias linfonodais gástricas (adaptado da JGCA).[13]

Cadeia	Definição
1	Paracárdico direito
2	Paracárdico esquerdo
3	Pequena curvatura
4sa	Grande curvatura, junto aos vasos breves
4sb	Grande curvatura, junto à artéria gastroepiplóica esquerda
4d	Grande curvatura, junto a ramos distais da artéria gastroepiplóica direita
5	Suprapilóricos
6	Infrapilóricos
7	Tronco da artéria gástrica esquerda
8a	Ântero-superior à artéria hepática comum
8p	Posterior à artéria hepática comum
9	Junto ao tronco celíaco
10	Hilo esplênico
11p	Porção proximal da artéria esplênica
11d	Porção distal da artéria esplênica
12a	Ligamento hepatoduodenal
12b	Ligamento hepatoduodenal, ao longo do ducto biliar
12p	Ligamento hepatoduodenal, ao longo da veia porta
13	Posterior à cabeça pancreática
14v	Junto à veia mesentérica superior
15	Junto aos vasos cólicos médios
16	Paraaórticos
17	Superfície anterior cabeça pancreática
18	Borda inferior do corpo pancreático
19	Infradiafragmáticos, ao longo da artéria subfrênica
20	Paraesofágico no hiato esofágico
110	Paraesofágico no tórax inferior
111	Supradiafragmático
112	Mediastinal posterior

Anexo J: Tabela 6 – Risco de comprometimento linfonodal por estação conforme a localização do tumor.[27]

Estação Linfonodal	Localização do Tumor *		
	Inferior	Médio	Superior
1	7%	16%	31%
2	0%	1%	13%
3	38%	40%	39%
4	35%	31%	11%
5	12%	3%	2%
6	49%	15%	3%
7	23%	22%	19%
8	25%	11%	7%
9	13%	8%	13%
10	0%	2%	10%
11	4%	4%	12%
12	8%	2%	1%
13, 14, 15, 16	0-5%	0-5%	0-5%

* Localização se refere à divisão do estômago em 3 porções (inferior, médio e superior).

Anexo K: Tabela 7 – Cadeias linfonodais a serem ressecadas de acordo com a localização da neoplasia.[13]

Localização *	Dissecção D1	Dissecção D2
S	1, 2, 3, 4sa, 4sb, 7	4d, 8a, 9, 10, 11p, 11d
MS/SM	1-7	8a, 9, 10, 11p, 11d, 12a
IM/M/MI	1, 3, 4sb, 4d, 5, 6, 7	8a, 9, 11p, 12a
ID/I	3, 4d, 5, 6, 7	1, 8a, 9, 11p, 12a, 14v
IMS	1-7	8a, 9, 10, 11p, 11d, 12a, 14v

* Porções gástricas: S=superior, M=médio, I=inferior. A letra D se refere ao duodeno. Quando a lesão envolve mais de uma parte ela é descrita pela letra da área mais acometida primeiro.

Anexo L: Termo de consentimento informado (página 1/3).

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octavio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde,
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : .....SEXO: .....
DATA NASCIMENTO:.....
ENDEREÇO:.....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: .....
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **"Impacto da solução de Carnoy no número de linfonodos resgatados em peças cirúrgicas de cânceres colo-retal e gástrico: estudo prospectivo randomizado."**

2. PESQUISADOR: **Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Junior**
CARGO/FUNÇÃO: Médico Coordenador do Serviço de Cirurgia Oncológica do Aparelho Digestivo – ICESP
CRM: 56337
UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Cirurgia Oncológica do Aparelho Digestivo do Instituto do Câncer Estado de São Paulo

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Dois anos

Rubrica Paciente_____ Rubrica Responsável pelo Consentimento_____

Anexo M: Termo de consentimento informado (página 2/3).

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa pois irá realizar uma cirurgia no estômago ou no intestino devido a câncer. Esta pesquisa tem o objetivo de verificar qual é o melhor método para detectar a quantidade de linfonodos (ínguas) que foram retirados junto com o tumor na sua cirurgia. Para isso, este material retirado na sua cirurgia será imerso (mergulhado) em um de dois tipos de soluções (líquidos) diferentes: o Carnoy ou o Formaldeído. A pesquisa se intitula "**Impacto da solução de Carnoy no número de linfonodos resgatados em peças cirúrgicas de cânceres colo-retal e gástrico: estudo prospectivo randomizado**".

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros

Caso você aceite participar desta pesquisa, um sorteio definirá em qual solução o material retirado na sua cirurgia será analisado: o Formaldeído, que já é rotina neste hospital, ou o Carnoy que ainda não é utilizado na rotina desta instituição. Depois este material será estudado pela equipe da patologia desta pesquisa. As duas soluções são fixadoras conhecidas, seguras e utilizadas normalmente. A sua participação nesta pesquisa não implica na realização de nenhum exame adicional.

3 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do item 2

Como se trata de uma análise apenas do material retirado da cirurgia, não haverá nenhuma intervenção direta ao participante desta pesquisa, por isso, não há nenhum risco direto esperado neste procedimento. A todos participantes será garantida assistência para qualquer problema decorrente da realização de qualquer intervenção neste estudo. Todos os procedimentos deste protocolo serão realizados por profissionais treinados, experientes e habilitados.

4 – Benefícios para o participante

Como ainda não sabemos se a solução de Carnoy, se comparado ao formaldeído, possibilita detectar um maior número de linfonodos no material retirado na sua cirurgia, somente ao final do estudo poderemos concluir se o paciente teve algum benefício em participar desta pesquisa. Caso aceite participar desta pesquisa, o material proveniente de sua cirurgia será submetido a uma análise mais detalhada. Caso se observe no estudo alguma alteração, você será encaminhado para tratamento específico e individualizado, ou seja, se encontrado algum linfonodo com células tumorais (câncer) poderá haver a possibilidade de fazer quimioterapia.

5 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar

Caso você não aceite participar desta pesquisa, o material retirado da sua cirurgia será imerso em solução de Formaldeído, que é rotina nesta instituição. No estudo, a escolha da solução é ao acaso.

6 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Junior. que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 251 - 6º Andar, Cerqueira César, São Paulo, SP. CEP 01246-000. Telefone: 11-3893-2000. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Teodoro Sampaio, 115, 1º andar – Instituto Oscar Freire, CEP 05405-000. Telefone: 3061-7280, FAX: 3061-8215, e-mail: cep.fm@usp.br

7 - Garantia da liberdade da retirada de consentimento

Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Rubrica Paciente_____ Rubrica Responsável pelo Consentimento_____

Anexo N: Termo de consentimento informado (página 3/3).

8 - Direito de confidencialidade
As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
9 - Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas
Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados dos exames, ou qualquer outro procedimento desta pesquisa que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

10 - Despesas e compensações
Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira, sua participação nesta pesquisa é voluntária. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Você terá o direito de solicitar indenização no caso de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

11 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Impacto da solução de Carnoy no número de linfonodos resgatados em peças cirúrgicas de cânceres colo-retal e gástrico: estudo prospectivo randomizado". Eu discuti com o médico sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.
Assino 2 (duas) vias deste documento, as quais uma ficará com o médico e sua equipe e a outra via será entregue para mim.

_____ **Data** ___/___/___
Assinatura do paciente/representante legal

_____ **Data** ___/___/___
Assinatura da testemunha

(para participantes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____ **Data** ___/___/___
Assinatura do médico que obteve o consentimento

Anexo O: Ficha de coleta dos dados prospectivos (frente).

PROTOCOLO CARNOY – FASE PROSPECTIVA

GRUPO SELECIONADO (PREENCHIDO APÓS SORTEIO):

☐ CARNOY

☐ FORMOL

DADOS DO PACIENTE:

Nome:_____RGHC:_____

Diagnóstico pré-operatório: _____

Estadiamento pré-operatório: _____

Sexo: _____ Idade: _____ Peso: _____ altura: _____ IMC: _____

Co-morbidades: ☐ HAS ☐ DM ☐ DPOC ☐ outras: _____

Cirurgia abdominal prévia ? ☐ NÃO ☐ SIM. Qual ?:_____

DADOS DA CIRURGIA:

Data da Operação: _____

Cirurgia realizada:_____

Localização da doença :_____

Detalhes da cirurgia: _____

☐ Curativa ☐ Paliativa. Por quê?:_____

Data e horário em que a peça foi colocada na solução:_____

Anexo P: Ficha de coleta dos dados prospectivos (verso).

DADOS DA PATOLOGIA:

MACROSCOPIA

Grupo do protocolo: ☐ Carnoy ☐ Formol

Data e horário em que a peça foi retirada da solução:_____

Tempo utilizado na dissecção linfonodal (min):_____

Tamanho máximo dos linfonodos encontrados:_____

Tamanho mínimo dos linfonodos encontrados:_____

Número de linfonodos menores que 5mm:_____

Linfonodos comprometidos/Linfonodos totais:_____

Estadiamento 7ª edição TNM:_____

REVISÃO DA GORDURA RESIDUAL EM CARNOY (GRUPO FORMOL)

Data e horário em que a peça foi colocada no Carnoy:_____

Data e horário em que a peça foi retirada do Carnoy:_____

Tempo utilizado na dissecção linfonodal (min):_____

Tamanho máximo dos linfonodos encontrados:_____

Tamanho mínimo dos linfonodos encontrados:_____

Número de linfonodos menores que 5mm:_____

Linfonodos comprometidos/Linfonodos totais:_____

Estadiamento 7ª edição TNM:_____

Revisão modificou o estadiamento: ☐ Sim ☐ Não

Anexo Q: Tabela 10 – Dados prospectivos coletados, grupo Carnoy.

Grupo Carnoy									
Caso	Idade	Sexo	IMC	Tempo dissecção	Menor LN	Maior LN	LNs < 5mm	LN+/LN	TNM (7a ed.)
1	78 anos	M	19	35min	1mm	13mm	45	5+/64	IIIB (pT4a pN2)
2	43 anos	F	23	35min	2mm	9mm	16	0+/30	IA (pT1b pN0)
3	50 anos	F	17	30min	1mm	9mm	25	0+/44	IA (pT1b pN0)
4	82 anos	F	29	40min	1mm	12mm	37	0+/57	IA (pT1b pN0)
5	72 anos	F	18	30min	1mm	20mm	17	4+/40	IIIB (pT4a pN2)
6	72 anos	F	29	37min	1mm	25mm	39	3+/60	IIIB (pT4a pN2)
7	54 anos	F	31	35min	1mm	30mm	22	0+/39	IIA (pT3 pN0)
8	67 anos	M	28	55min	1mm	20mm	43	7+/79	IIIB (pT3 pN3)
9	73 anos	M	28	50min	1mm	20mm	66	0+/70	IB (pT2 pN0)
10	80 anos	M	26	45min	1mm	10mm	37	0+/51	IIA (pT3 pN0)
11	75 anos	F	24	60min	1mm	25mm	25	10+/44	IIIC (pT4a pN3a)
12	71 anos	M	22	60min	1mm	20mm	14	1+/34	IIA (pT2 pN1)
13	47 anos	F	23	40min	2mm	20mm	17	0+/38	IA (pT1b pN0)
14	43 anos	F	25	38min	1mm	23mm	49	0+/57	0 (pTis pN0)
15	57 anos	F	39	60min	1mm	25mm	29	23+/52	IIIB (pT3 pN3b)
16	58 anos	F	31	40min	1mm	20mm	58	0+/69	IB (pT2 pN0)
17	57 anos	F	19	42min	1mm	20mm	15	0+/25	IA (pT1b pN0)
18	56 anos	M	24	40min	1mm	25mm	35	0+/65	IB (pT2 pN0)
19	77 anos	F	23	50min	1mm	18mm	51	0+/69	IA (pT1a pN0)
20	84 anos	M	19	60min	1mm	20mm	13	0+/29	IIA (pT3 pN0)
21	61 anos	M	22	40min	1mm	20mm	48	0+/63	IB (pT2 pN0)
22	65 anos	M	35	40min	1mm	22mm	41	0+/46	IA (pT1a pN0)
23	77 anos	M	23	58min	1mm	40mm	34	0+/43	IA (pT1a pN0)
24	61 anos	F	21	48min	2mm	27mm	47	0+/49	IIA (pT3 pN0)
25	73 anos	F	18	43min	1mm	20mm	28	5+/42	IIIB (pT4a pN2)

Anexo R: Tabela 11 – Dados prospectivos coletados, braço Formol: grupos Formol, Revisão e Formol+Revisão.

Braço Formol do estudo																	
				Grupo Formol						Grupo Revisão					Formol+Revisão		
Caso	Idade	Sexo	IMC	Tempo dissecção	Menor LN	Maior LN	LNs < 5mm	LN+/LN	TNM (7a ed.)	Tempo dissecção	Menor LN	Maior LN	LNs < 5mm	LN+/LN	LN+/LN final	TNM (7a ed.)	Revisão alterou TNM
1	82 anos	M	24	30min	1mm	11mm	39	3+/49	IIIA (pT3 pN2)	15min	1mm	2mm	4	0+/4	3+/53	IIIA (pT3 pN2)	Não
2	65 anos	M	23	40min	1mm	7mm	23	1+/29	IIIA (pT4a pN1)	20min	1mm	1mm	3	0+/3	1+/32	IIIA (pT4a pN1)	Não
3	59 anos	M	26	30min	2mm	8mm	13	0+/17	IA (pT1a pN0)	20min	1mm	2mm	5	0+/5	0+/22	IA (pT1a pN0)	Não
4	80 anos	F	27	30min	1mm	19mm	42	9+/58	IIIC (pT4a pN3a)	30min	1mm	2mm	21	3+/21	12+/79	IIIC (pT4a pN3a)	Não
5	64 anos	M	26	40min	1mm	14mm	54	0+/70	IA (pT1b pN0)	20min	1mm	1mm	1	0+/1	0+/71	IA (pT1b pN0)	Não
6	65 anos	M	24	40min	3mm	12mm	27	8+/52	IIIB (pT3 pN3a)	30min	1mm	7mm	20	3+/21	11+/73	IIIB (pT3 pN3a)	Não
7	61 anos	F	24	37min	1mm	24mm	16	0+/28	IA (pT1a pN0)	20min	1mm	2mm	27	0+/27	0+/55	IA (pT1a pN0)	Não
8	56 anos	F	26	40min	2mm	15mm	14	4+/30	IIIB (pT4a pN2)	30min	1mm	3mm	14	1+/14	5+/44	IIIB (pT4a pN2)	Não
9	63 anos	F	32	50min	1mm	15mm	19	2+/28	IB (pT1a pN1)	35min	1mm	3mm	26	1+/26	3+/54	IIA (pT1a pN2)	Sim
10	73 anos	F	27	60min	2mm	25mm	10	0+/26	IA (pT1b pN0)	40min	1mm	3mm	17	0+/17	0+/43	IA (pT1b pN0)	Não
11	55 anos	M	24	60min	1mm	26mm	28	1+/46	IIIA (pT4a pN1)	30min	1mm	3mm	15	1+/15	2+/61	IIIA (pT4a pN1)	Não
12	55 anos	F	24	50min	1mm	18mm	15	1+/24	IB (pT1b pN1)	30min	1mm	3mm	26	0+/26	1+/50	IB (pT1b pN1)	Não
13	73 anos	M	28	60min	1mm	24mm	15	3+/26	IIIA (pT3 pN2)	40min	1mm	2mm	13	0+/13	3+/39	IIIA (pT3 pN2)	Não
14	66 anos	F	26	50min	1mm	12mm	15	6+/22	IIA (pT1b pN2)	30min	1mm	2mm	11	2+/11	8+/33	IIB (pT1b pN3a)	Sim
15	75 anos	F	29	63min	1mm	10mm	16	0+/21	IA (pT1b pN0)	27min	1mm	2mm	6	0+/6	0+/27	IA (pT1b pN0)	Não
16	68 anos	M	27	40min	1mm	20mm	6	0+/25	IIA (pT3 pN0)	25min	1mm	2mm	9	0+/9	0+/34	IIA (pT3 pN0)	Não
17	72 anos	M	18	58min	1mm	25mm	12	9+/28	IIIC (pT4a pN3a)	30min	1mm	2mm	17	1+/17	10+/45	IIIC (pT4a pN3a)	Não
18	74 anos	F	22	62min	1mm	21mm	20	0+/35	IA (pT1b pN0)	30min	1mm	3mm	11	0+/11	0+/46	IA (pT1b pN0)	Não
19	62 anos	M	22	62min	1mm	13mm	27	8+/37	IIIB (pT3 pN3a)	37min	1mm	3mm	28	1+/28	9+/65	IIIB (pT3 pN3a)	Não
20	58 anos	F	17	50min	1mm	30mm	21	1+/32	IIA (pT2 pN1)	20min	1mm	2mm	11	0+/11	1+/43	IIA (pT2 pN1)	Não
21	42 anos	F	25	54min	1mm	20mm	32	2+/48	IIIA (pT4a pN1)	32min	1mm	3mm	47	0+/47	2+/95	IIIA (pT4a pN1)	Não
22	66 anos	F	40	55min	1mm	25mm	35	0+/42	IA (pT1b pN0)	38min	1mm	2mm	28	0+/28	0+/70	IA (pT1b pN0)	Não
23	74 anos	M	18	60 min	1mm	16mm	22	0+/36	IIA (pT3 pN0)	30min	1mm	2mm	21	0+/21	0+/57	IIA (pT3 pN0)	Não
24	73 anos	M	27	48min	1mm	12mm	25	0+/27	IA (pT1b pN0)	27min	1mm	3mm	19	0+/19	0+/46	IA (pT1b pN0)	Não
25	66 anos	F	33	60min	1mm	20mm	30	5+/35	IIIA (pT3 pN2)	32min	1mm	2mm	21	0+/21	5+/56	IIIA (pT3 pN2)	Não

Anexo S: Tabela 12 – Dados retrospectivos coletados.

Grupo Retrospectivo					
Caso	**Idade**	**Sexo**	**IMC**	**LN+/LN**	**TNM (7a ed.)**
1	75 anos	F	22	0+/24	IA (pT1b pN0)
2	76 anos	F	26	0+/39	IA (pT1a pN0)
3	71 anos	F	37	0+/20	IB (pT2 pN0)
4	68 anos	F	26	0+/22	IA (pT1a pN0)
5	78 anos	F	15	6+/23	IIIA (pT3 pN2)
6	76 anos	F	27	0+/14	IA (pT1b pN0)
7	68 anos	M	24	5+/49	IIIB (pT4a pN2)
8	49 anos	M	29	0+/39	IA (pT1b pN0)
9	51 anos	F	25	16+/40	IIIC (pT4a pN3b)
10	74 anos	M	21	0+/32	IB (pT2 pN0)
11	65 anos	F	18	6+/14	IIIA (pT3 pN2)
12	50 anos	F	27	0+/51	IA (pT1b pN0)
13	71 anos	M	32	0+/37	IA (pT1b pN0)
14	60 anos	F	25	5+/38	IIIB (pT4a pN2)
15	82 anos	F	24	0+/53	IA (pT1b pN0)
16	57 anos	F	27	0+/35	IA (pT1a pN0)
17	74 anos	M	25	0+/42	IA (pT1a pN0)
18	41 anos	F	22	0+/32	IA (pT1a pN0)
19	67 anos	M	28	0+/16	IA (pT1b pN0)
20	42 anos	F	24	0+/55	IA (pT1a pN0)
21	56 anos	M	18	3+/34	IIB (pT2 pN2)
22	69 anos	M	25	0+/39	IIA (pT3 pN0)
23	74 anos	F	24	0+/27	IA (pT1b pN0)
24	69 anos	M	25	0+/53	IB (pT1 pN1)
25	75 anos	M	15	8+/34	IIIC (pT4a pN3a)

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Zilberstein B, Jacob CE, Cecconello I. Gastric cancer trends in epidemiology. Arq Gastroenterol. 2012 Jul-Sep;49(3):177-8.

2. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). http://www2.inca.gov.br.

3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 8th ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2010.

4. Nashimoto A, Akazawa K, Isobe Y, Miyashiro I, Katai H, Kodera Y, et al. Gastric cancer treated in 2002 in Japan: 2009 annual report of the JGCA nationwide registry. Gastric Cancer. 2013 Jan;16(1):1-27.

5. Nakamura K, Ueyama T, Yao T, Xuan ZX, Ambe K, Adachi Y, et al. Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. Cancer. 1992; 70:1030–7.

6. Ahn HS, Lee HJ, Yoo MW, Jeong SH, Park DJ, Kim HH, et al. Changes in clinicopathological features and survival after gastrectomy for gastric cancer over a 20-year period. Br J Surg. 2011 Feb;98(2):255-60.

7. Kikuchi S, Futawatari N, Sakuramoto S, Katada N, Yamashita K, Shibata T, et al. Comparison of staging between the old (6th edition) and new (7th edition) TNM classifications in advanced gastric cancer. Anticancer Res. 2011 Jun;31(6):2361-5.

8. Fang WL, Huang KH, Chen JH, Lo SS, Hsieh MC, Shen KH, et al. Comparison of the survival difference between AJCC 6th and 7th editions for gastric cancer patients. World J Surg. 2011 Dec;35(12):2723-9.

9. Reim D, Loos M, Vogl F, Novotny A, Schuster T, Langer R, et al. Prognostic implications of the seventh edition of the international union against cancer classification for patients with gastric cancer: the Western experience of patients treated in a single-center European institution. J Clin Oncol. 2013 Jan 10;31(2):263-71.

10. Wang J, Dang P, Raut CP, Pandalai PK, Maduekwe UN, Rattner DW, et al. Comparison of a lymph node ratio-based staging system with the 7th AJCC system for gastric cancer: analysis of 18,043 patients from the SEER database. Ann Surg. 2012 Mar;255(3):478-85.

11. Zilberstein B, Mucerino DR, Yagi OK, Ribeiro-Junior U, Lopasso FP, Bresciani C, et al. Resultados da gastrectomia D2 para o câncer gástrico: dissecção da cadeia linfática ou ressecção linfonodal múltipla?. ABCD, arq. bras. cir. dig.. 2012 Sep [cited 2014 May 31]; 25(3):161-4.

12. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, eds. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer; 2009.

13. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3). Gastric Cancer. 2011 Jun;14(2):113-23.

14. Sun J, Song Y, Wang Z, Chen X, Gao X, Xu Y, et al. Clinical significance of palliative gastrectomy on the survival of patients with incurable advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. BMC Cancer. 2013 Dec 5;13:577.

15. Zilberstein B, Malheiros C, Lourenço LG, Kassab P, Jacob CE, Weston AC, et al. Consenso brasileiro sobre câncer gástrico: diretrizes para o câncer gástrico no Brasil. Arq Bras Cir Dig. 2013 Jan-Mar;26(1):2-6.

16. Takahashi T, Saikawa Y, Kitagawa Y. Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment. Cancers (Basel). 2013 Jan 16;5(1):48-63.

17. Wang W, Xu DZ, Li YF, Guan YX, Sun XW, Chen YB, et al. Tumor-ratio-metastasis staging system as an alternative to the 7th edition UICC TNM system in gastric cancer after D2 resection--results of a single-institution study of 1343 Chinese patients. Ann Oncol. 2011 Sep;22(9):2049-56.

18. Wang W, Sun XW, Li CF, Lv L, Li YF, Chen YB, et al. Comparison of the 6th and 7th editions of the UICC TNM staging system for gastric cancer: results of a Chinese single-institution study of 1,503 patients. Ann Surg Oncol. 2011 Apr;18(4):1060-7.

19. Marrelli D, Morgagni P, de Manzoni G, Coniglio A, Marchet A, Saragoni L, et al. Prognostic value of the 7th AJCC/UICC TNM classification of noncardia gastric cancer: analysis of a large series from specialized Western centers. Ann Surg. 2012 Mar;255(3):486-91.

20. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma--2nd English edition--response assessment of chemotherapy and radiotherapy for gastric carcinoma: clinical criteria. Gastric Cancer. 2001;4(1):1-8.

21. Degiuli M, Sasako M, Ponti A, Vendrame A, Tomatis M, Mazza C, et al. Randomized clinical trial comparing survival after D1 or D2 gastrectomy for gastric cancer. Br J Surg. 2014 Jan;101(2):23-31.

22. Songun I, Putter H, Kranenbarg EM, Sasako M, van de Velde CJ. Surgical treatment of gastric cancer: 15-year follow-up results of the randomised nationwide Dutch D1D2 trial. Lancet Oncol. 2010 May;11(5):439-49.

23. Volpe CM, Koo J, Miloro SM, Driscoll DL, Nava HR, Douglass HO Jr. The effect of extended lymphadenectomy on survival in patients with gastric adenocarcinoma. J Am Coll Surg. 1995 Jul;181(1):56-64.

24. Sano T, Sasako M, Yamamoto S, Nashimoto A, Kurita A, Hiratsuka M, et al. Gastric cancer surgery: morbidity and mortality results from a prospective randomized controlled trial comparing D2 and extended para-aortic lymphadenectomy--Japan Clinical Oncology Group study 9501. J Clin Oncol. 2004 Jul 15;22(14):2767-73

25. Roviello F, Pedrazzani C, Marrelli D, Di Leo A, Caruso S, Giacopuzzi S, et al. Super-extended (D3) lymphadenectomy in advanced gastric cancer. Eur J Surg Oncol. 2010 May;36(5):439-46.

26. Wu CW, Hsiung CA, Lo SS, Hsieh MC, Chen JH, Li AF, et al. Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2006 Apr;7(4):309-15.

27. Maruyama K, Gunvén P, Okabayashi K, Sasako M, Kinoshita T. Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients. Ann Surg. Nov 1989; 210(5): 596–602.

28. Wagner PK, Ramaswamy A, Ruschoff J, Schmitz-Moormann, Rothmund M. Lymph node counts in the upper abdomen: anatomical basis for lymphadenectomy in gastric cancer. Br J Surg. 1991 Jul;78(7):825-7.

29. Xu D, Huang Y, Geng Q, Guan Y, Li Y, Wang W, et al. Effect of lymph node number on survival of patients with lymph node-negative gastric cancer according to the 7th edition UICC TNM system. PLoS One. 2012;7(6):e38681.

30. Ichikura T, Ogawa T, Chochi K, Kawabata T, Sugasawa H, Mochizuki H. Minimum number of lymph nodes that should be examined for the International Union Against Cancer/American Joint Committee on Cancer TNM classification of gastric carcinoma. World J Surg. 2003 Mar;27(3):330-3.

31. Coburn NG, Swallow CJ, Kiss A, Law C. Significant regional variation in adequacy of lymph node assessment and survival ingastric cancer. Cancer. 2006 Nov 1;107(9):2143-51.

32. Kesley R, Correa JHS, Castro L, Souza-Filho O, Oliveira IM, Pinto CE, et al. Lymph nodes number in surgical specimen modifies prognosis in advanced stage gastric cancer patients- study of the will- rogers phenomenon. Applied Cancer Research. 2005;25(3):122-9.

33. Baiocchi GL, Tiberio GA, Minicozzi AM, Morgagni P, Marrelli D, Bruno L, et al. A multicentric Western analysis of prognostic factors in advanced, node-negative gastric cancer patients. Ann Surg. 2010 Jul;252(1):70-3.

34. Seevaratnam R, Bocicariu A, Cardoso R, Yohanathan L, Dixon M, Law C, et al. How many lymph nodes should be assessed in patients with gastric cancer? A systematic review. Gastric Cancer. 2012 Sep;15 Suppl 1:S70-88.

35. Chang-Ming H, Jian-Xian L, Chao-Hui Z, Li P, Xie JW, Wang JB. Impact of the Number of Dissected Lymph Nodes on Survival for Gastric Cancer after Distal Subtotal Gastrectomy. Gastroenterology Research and Practice, vol 2011, Article ID 476014, 2011. http://dx.doi.org/10.1155/2011/476014.

36. Jacob CE. Câncer gástrico precoce: estudo dos parâmetros clínicos e histopatológicos; correlação com a sobrevida a longo prazo. Tese de doutorado, FMUSP. 2003.

37. de Aretxabala X, Konishi K, Yonemura Y, Ueno K, Yagi M, Noguchi M, et al. Node dissection in gastric cancer. Br J Surg. 1987 Sep;74(9):770-3.

38. Jang YJ, Park MS, Park SS, Kim JH, An H, Park SH, et al. Surgeon subspecialty as a factor in improving long-term outcomes for gastric cancer: Twenty years of experience in Korea. Arch Surg. 2010 Nov;145(11):1091-6.

39. Xirasagar S, Lien YC, Lin HC, Lee HC, Liu TC, Tsai J. Procedure volume of gastric cancer resections versus 5-year survival. Eur J Surg Oncol. 2008 Jan;34(1):23-9.

40. Abbassi-Ghadi N, Boshier PR, Goldin R, Hanna GB. Techniques to increase lymph node harvest from gastrointestinal cancer specimens: a systematic review and meta-analysis. Histopathology. 2012 Jun 26;61(4):531-42.

41. Candela FC, Urmacher C, Brennan MF. Comparison of the conventional method of lymph node staging with a comprehensive fat-clearing method for gastric adenocarcinoma. Cancer. 1990 Oct 15;66(8):1828-32.

42. Koren R, Kyzer S, Levin I, Klein B, Halpern M, Rath-Wolfson L, et al. Lymph node revealing solution: a new method for lymph node sampling: results in gastric adenocarcinoma. Oncol Rep. 1998 Mar-Apr;5(2):341-4.

43. Siqueira PR, Nadal SR, Santo GC, Silva MM, Rodrigues FCM, Malheiros CA. Efficacy of lymph nodes revealing solution in gastrectomy with lymphadenectomy specimens from gastric carcinoma. Rev. Col. Bras. Cir. 2000 Aug [cited 2014 May 31]; 27(4):221-6.

44. Luebke T, Baldus SE, Zirbes TK, Pham TD, Schneider PM, Dienes HP, et al. Lymph node revealing solution in gastric carcinoma does not provide upstaging of the N-status. Oncol Rep. 2005 Feb;13(2):361-5.

45. Kim JH, Park JM, Jung CW, Park SS, Kim SJ, Mok YJ, et al. The significances of lymph node micrometastasis and its correlation with E-cadherin expression in pT1-T3N0 gastric adenocarcinoma. J Surg Oncol. 2008 Feb 1;97(2):125-30.

46. Dell'Aquila NF Jr, Lopasso FP, Falzoni R, Iriya K, Gama-Rodrigues J. Prognostic significance of occult lymph node micrometastasis in gastric cancer: a histochemical and immunohistochemical study based on 1997 UICC TNM and 1998 JGCA classifications. ABCD, arq. bras. cir. dig.. 2008; 21(4):164-9.

47. Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL, Wan J. Effect of lymph node micrometastases on prognosis of gastric carcinoma. World J Gastroenterol. 2007;13:4122–5.

48. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Higashi H, Watanabe T, et al. Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer. Am Surg. 2003 Jul;69(7):573-7.

49. Yasuda K, Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Takeuchi H, Kitano S. Prognostic effect of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative gastric cancer. Ann Surg Oncol. 2002 Oct;9(8):771-4.

50. Noda N, Sasako M, Yamaguchi N, Nakanishi Y. Ignoring small lymph nodes can be a major cause of staging error in gastric cancer. Br J Surg. 1998 Jun;85(6):831-4.

51. Carson FL, Hladik C. Histotechnology: A Self-Instructional Text. 3rd ed. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press, 2009.

52. Luz DA, Ribeiro U Jr, Chassot C, Collet E Silva F de S, Cecconello I, Corbett CE. Carnoy's solution enhances lymph node detection: an anatomical dissection study in cadavers. Histopathology. 2008 Dec;53(6):740-2.

53. Baker JR. Principles of biological microtechnique. London: Methuen; 1958.

54. Carnoy JB. La biologie cellulaire. Paris: Lierre; 1884.

55. Presnell JK, Schreibman MP. Humason's animal tissue techniques, 5th ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1997.

56. Tsai C. Comparing DNA Damage Caused by Formaldehyde, Glutaraldehye, Carnoy's and Methacarn in Cancer Tissue Fixations. Electronic Thesis or Dissertation. Bowling Green State University, 2006. https://etd.ohiolink.edu/.

57. Puchtler H, Waldrop FS, Conner HM, Terry MS. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. Histochemie. 1968;16(4):361-71.

58. Strobel S, Miller HR, Ferguson A. Human intestinal mucosal mast cells: evaluation of fixation and staining techniques. J Clin Pathol. 1981 Aug;34(8):851-8.

59. Santos JT, Silva-Santos KC, Andrade ER, Lisboa LA, Schneider CL, Ciquini A, et al. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of bovine preantral ovarian follicles. Semina: Ciências Agrárias, Londrina. 2012; 33(1):297-304.

60. Gokhale S, Ololade O, Adegboyega PA. Effect of tissue fixatives on the immunohistochemical expression of ABH blood group isoantigens. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002;10(3):282-6.

61. Gong Y, Symmans WF, Krishnamurthy S, Patel S, Sneige N. Optimal fixation conditions for immunocytochemical analysis of estrogen receptor in cytologic specimens of breast carcinoma. Cancer. 2004; 25;102(1):34-40.

62. Uneyama C, Shibutani M, Masutomi N, Takagi H, Hirose M. Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. J Histochem Cytochem. 2002 Sep;50(9):1237-45.

63. Rieger J, Twardziok S, Huenigen H, Hirschberg RM, Plendl J. Porcine intestinal mast cells. Evaluation of different fixatives for histochemical staining techniques considering tissue shrinkage. Eur J Histochem. 2013 Jul 30;57(3):e21.

64. Lehmann T, Völkl A, Fahimi HD. The importance of tissue fixation for light microscopic immunohistochemical localization of peroxisomal proteins: the superiority of Carnoy's fixative over Baker's formalin and Bouin's solution. Histochem Cell Biol. 1995;103(3):187-95.

65. Takagi H, Shibutani M, Kato N, Fujita H, Lee KY, Takigami S, et al. Microdissected Region-specific Gene Expression Analysis with Methacarn-fixed, Paraffin-embedded Tissues by Real-time RT-PCR. J Histochem Cytochem. 2004;52(7):903-13.

66. Giannella C, Zito FA, Paradiso A, Marzullo F, Alaibac M, et al. Comparison of formalin, ethanol and Histochoice fixation on the PCR amplification from paraffin-embedded breast cancer tissue. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1997;35(8):633-5.

67. Urieli-Shoval S, Meek RL, Hanson RH, Ferguson M, Gordon D, Benditt EP. Preservation of RNA for in situ hybridization: Carnoy's versus formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem. 1992;40(12):1879-85.

68. Foss RD, Guha-Thakurta N, Conran RM, Gutman P. Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls. Diagn Mol Pathol. 1994;3(3):148-55.

69. Milcheva R, Janega P, Celec P, Russev R, Babál P. Alcohol based fixatives provide excellent tissue morphology, protein immunoreactivity and RNA integrity in paraffin embedded tissue specimens. Acta Histochem. 2013 Apr;115(3):279-89.

70. Pereira MA, Dias AR, Cirqueira CS, Tomitao MT, Ribeiro U Jr, Mello ES. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. Em consideração para publicação.

71. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATRDS). http://www.atsdr.cdc.gov.

72. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGHI). Threshold Limit Values (TlVs) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs). Cincinnati, OH; 2001.

73. First Consolidated List of Indicative Occupational Exposure Limit Values (IOELV). www.hse.gov.uk/condocs.

74. Rossberg M, Lendle W, Pfleiderer G, Tögel A, D EL, Langer E, et al. Chlorinated Hydrocarbons. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley Online Library. 2006.

75. Nightingale PD, Malin G, Liss PS. Production of chloroform and other low molecular-weight halocarbons by some species of macroalgae. Limnol. Oceanogr. 1995; 40(4):680-9.

76. Srebnik M, Laloë E. "Chloroform" in Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. Wiley Online Library . 2001.

77. Perrin DD, Armarego WLF. Purification of Laboratory Chemicals. Oxford: Pergamon Press; 2009.

78. Gordon HL. Sir James Young Simpson and Chloroform (1811–1870). http://www.gutenberg.org/files/34128/34128-h/34128-h.htm.

79. Martin W. A Case of Chloroform Poisoning; Recovery. Br Med J. 1886; 2(1331):16–7.

80. Knight PR III, Bacon DR. An Unexplained Death: Hannah Greener and Chloroform. Anesthesiology. 2002; 96 (5):1250–3

81. Payne JP. The criminal use of chloroform. Anaesthesia. 1998; 53:685–90.

82. Medical Annotation. Chloroform amongst Thieves. Lancet. 1865; 2:490 – 1.

83. Japiassu M. Rhodia, um show que não pára nunca: Os 60 anos de uma empresa que sempre deu o que falar. Revista Isto é. 25.11.1978, p. 84.

84. Legislação brasileira. http://www2.camara.leg.br.

85. College of American Pathologists. http://www.cap.org.

86. Kiernan JA. Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2000.

87. Michalany J. Técnica histológica em anatomia patológica. 3 rd ed. São Paulo: Michelany; 1981.

88. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2010.

89. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965;64:31-49.

90. Luebke T, Baldus SE, Grass G, Bollschweiler E, Thiele J, Dienes HP, et al. Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis. World J Surg. 2005 Nov;29(11):1422-7; discussion 1428.

91. Paula GA. Modelos de Regressão com apoio computacional. São Paulo: IME-USP; 2004.

92. Roth AD. Curative treatment of gastric cancer: towards a multidisciplinary approach? Crit Rev Oncol Hematol. 2003 Apr;46(1):59-100.

93. Marchet A, Mocellin S, Ambrosi A, de Manzoni G, Di Leo A, Marrelli D, et al. The prognostic value of N-ratio in patients with gastric cancer: validation in a large, multicenter series. Eur J Surg Oncol. 2008 Feb;34(2):159-65.

94. Bunt AM, Hermans J, van de Velde CJ, Sasako M, Hoefsloot FA, Fleuren G, et al. Lymph node retrieval in a randomized trial on western-type versus Japanese-type surgery in gastric cancer. J Clin Oncol. 1996 Aug;14(8):2289-94.

95. Chen K, Xu XW, Mou YP, Pan Y, Zhou YC, Zhang RC, et al. Systematic review and meta-analysis of laparoscopic and open gastrectomy for advanced gastric cancer. World J Surg Oncol. 2013 Aug 8;11:182.

96. Damin DC, Rosito MA, Contu PC, Tarta C, Ferreira PR, Kliemann LM, et al. Lymph node retrieval after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. J Gastrointest Surg. 2012 Aug;16(8):1573-80.