



JOSÉ ROBERTO ALVES

**“PADRONIZAÇÃO DA PESQUISA DE LINFONODOS
SENTINELAS EM ESTÔMAGO POR MÉTODOS
COMBINADOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM COELHOS”**

**“STANDARDIZATION OF SENTINEL LYMPH NODE
NAVIGATION IN STOMACH BY COMBINED METHODS:
EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS”**

**CAMPINAS
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

JOSÉ ROBERTO ALVES

**PADRONIZAÇÃO DA PESQUISA DE LINFONODOS SENTINELAS
EM ESTÔMAGO POR MÉTODOS COMBINADOS: ESTUDO
EXPERIMENTAL EM COELHOS**

Orientador/Supervisor: Prof.Dr. Luiz Roberto Lopes

Co-Orientador/Co-Supervisor: Prof.Dr. Celso Dario Ramos

*STANDARDIZATION OF SENTINEL LYMPH NODE NAVIGATION IN STOMACH
BY COMBINED METHODS: EXPERIMENTAL STUDY IN RABBITS*

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de **Doutor em Ciências**.

Doctorate thesis presented to the Surgery Sciences Postgraduation Programme of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Sciences.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO JOSÉ ROBERTO ALVES E ORIENTADA
PELO PROF. DR. LUIZ ROBERTO LOPES.**

Assinatura do orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

AL8p

Alves, José Roberto, 1980-
Padronização da pesquisa de linfonodos sentinelas
em estômago por métodos combinados : estudo
experimental em coelhos / José Roberto Alves. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Luiz Roberto Lopes.
Coorientador : Celso Darío Ramos.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Coelhos. 2. Modelos animais. 3. Biópsia de
linfonodo sentinela. 4. Corantes. 5. Tecnécio. I. Lopes,
Luiz Roberto, 1956-. II. Ramos, Celso Darío, 1964-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Standardization of sentinel lymph node navigation in stomach by
combined methods : experimental study in rabbits.

Palavras-chave em inglês:

Rabbits

Models, Animal

Sentinel lymph node biopsy

Coloring Agents

Technetium

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Luiz Roberto Lopes [Orientador]

Claudio Saddy Rodrigues Coy

Joaquim Murray Bustorff Silva

Paulo Kassab

Renato Santos de Oliveira Filho

Data da defesa: 12-09-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado

José Roberto Alves

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes
Co-Orientador: Prof. Dr. Celso Dario Ramos

Membros:

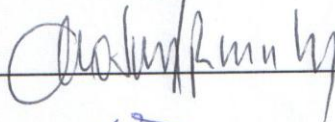
1. Prof(a). Dr(a). Luiz Roberto Lopes -



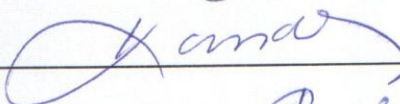
2. Prof(a). Dr(a). Joaquim Murray Bustorff Silva -



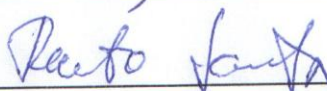
3. Prof(a). Dr(a). Claudio Saddy Rodrigues Coy -



4. Prof(a). Dr(a). Paulo Kassab -



5. Prof(a). Dr(a). Renato Santos de Oliveira Filho -



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/09/2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo constante incentivo e compreensão, pois sem eles nada disto seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas - SP (Unicamp-SP), pela credibilidade depositada e por ser o local onde realizei minha residência médica em cirurgia do aparelho digestivo e doutorado, aprimorando minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes, Professor Livre-Docente do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP-SP (FCM/Unicamp-SP), pelo privilégio de tê-lo como Orientador. Sou grato pela confiança, incentivo, contribuição intelectual e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Luciana Rodrigues Meirelles, Docente do Departamento de Anatomia Patológica da FCM/UNICAMP-SP, agradeço pelo auxílio relacionado ao estudo histológico.

Ao Prof. Dr. Celso Darío Ramos, Diretor do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da UNICAMP-SP e Docente da FCM/UNICAMP-SP, agradeço pela co-orientação e contribuição intelectual.

Ao Prof. Dr. Nelson Adami Andreollo, Professor Titular do Departamento de Cirurgia, Chefe da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório da FCM/UNICAMP-SP, exemplo de dedicação ao ensino e de mestre digno a todos que almejam algum dia ser professor. Amigo, pai, que sabe elogiar e criticar no momento adequado, para aqueles que estão ao seu lado crescerem como profissionais e pessoas, agradeço a honra de conhecê-lo, assim como pelos seus ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin, Professora Livre-Docente do Departamento de Cirurgia, Chefe do Grupo Fígado - Hipertensão Portal - Transplante da Disciplina de Moléstias do Aparelho Digestório da FCM/UNICAMP-SP, coordenadora da subcomissão de pós-graduação em Cirurgia, agradeço pela honra da amizade, ensinamentos durante a residência médica e pelo incentivo à pesquisa e à pós-graduação.

Às secretárias da pós-graduação (Paula e Juliana), pelo auxílio relacionado aos tramites para realização da qualificação e defesa desta tese.

À Tânia Sasasaki, médica residente de medicina nuclear da FCM/Unicamp, pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Ao Waldemir Benedito Costa (Dito), técnico do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da FCM da Unicamp – SP (LTCCE), pelo auxílio durante os experimentos.

Aos biólogos e técnicos do LTCCE: William Adalberto Silva, Ana Cristina de Moraes e Miguel Luis Candido.

Aos profissionais estatísticos, Cleide Aparecida Moreira Silva e Helymar da Costa Machado, pelas sugestões relacionadas à análise estatística deste estudo.

Ao Espaço da Escrita, criado pela reitoria da UNICAMP-SP, responsável pela tradução do *Abstract* e dos artigos científicos frutos dessa tese.

À Cristina Rosa Barbosa, farmacêutica, pelo auxílio no estudo piloto, base para criação desta tese, relacionado ao uso do azul patente e carvão ativado.

Aos docentes e preceptores da residência de cirurgia do aparelho digestivo da Unicamp.

À prof^a Dr^a Cláudia Alessi, professora de parasitologia da Faculdade de Medicina Dr. Domingos Leonardo Cerávolo da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) / Presidente Prudente - SP, meu sincero agradecimento a você e à sua família pela eterna amizade, constante apoio e oportunidades concedidas durante a graduação médica.

Ao prof Dr Enio Campos Amico, ex-professor de cirurgia da Faculdade de Medicina Dr. Domingos Leonardo Cerávolo da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE) / Presidente Prudente – SP e atual professor da Universidade Federal de Natal – RN, pelos ensinamentos durante a graduação médica e atual amizade.

Aos docentes da Faculdade de Medicina Dr. Domingos Leonardo Cerávolo da Universidade do Oeste Paulista (Presidente Prudente – SP), especialmente o prof. Dr. Nader Wafae, e **preceptores da Residência Médica de Cirurgia Geral da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo** (Sorocaba-SP), especialmente prof. Elson Yassunaga Teshirogi e prof. Nelson Boccato Júnior, agradeço pelos ensinamentos básicos que contribuíram para minha formação médico-profissional e inspiração acadêmica.

Aos médicos residentes de medicina nuclear da FCM/Unicamp, obrigado pela colaboração no preparo e manipulação do radiomarcador.

Ao LTCCE, local onde foram realizados os experimentos.

A FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro que possibilitou a concretização desta tese e seus frutos.

Aos meus pais, meu eterno agradecimento pelo apoio moral e financeiro, assim como pela perseverança em acreditar nos meus objetivos acadêmicos, fundamentais para tornar esta tese uma realidade.

“A medicina é uma ciência de verdades transitórias.”

Jorge Saad Souen, médico paulista.

SUMÁRIO

	PÁG.
RESUMO.....	xxvii
ABSTRACT.....	xxix
1- INTRODUÇÃO.....	31
1.1- Considerações Gerais.....	32
1.2- Câncer Gástrico Precoce e a Linfadenectomia.....	34
1.3- Pesquisa de Linfonodo Sentinela em Câncer Gástrico.....	35
1.4- Modelo Experimental de Treinamento em PLN sentinela.....	38
2- OBJETIVO.....	41
3- MATERIAL E MÉTODO.....	43
3.1- Considerações iniciais e caracterização da amostra.....	44
3.2- Anestesia.....	45
3.3- Experimento – Pesquisa de Linfonodos.....	47
3.4- Técnica padrão do procedimento cirúrgico (gastrectomia e esplenectomia).....	50
3.5- Estudo histológico.....	51
3.6- Análise estatística	51
4- RESULTADOS.....	53
4.1- Amostra, intercorrências e custo	54
4.2- Identificação dos linfonodos.....	55
4.3- Avaliação da radioatividade.....	60
5- DISCUSSÃO.....	63
5.1- Pesquisa de linfonodo sentinela em câncer gástrico precoce.....	64

5.2- Padronização de um modelo animal experimental.....	64
5.3- Método deste modelo animal.....	69
5.4- Acurácia dos métodos de pesquisa de linfonodos em estômago.....	72
5.5- Identificação e confirmação histológica dos linfonodos.....	74
5.6- Perspectivas futuras.....	77
6- CONCLUSÃO.....	79
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
8 – ANEXOS.....	97
8.1- ANEXO 1. Autorização LTCCE.....	97
8.2- ANEXO 2. Termo Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP...	99
8.3- ANEXO 3. Ficha de Cadastro do Animal.....	101
8.4- ANEXO 4. Conceitos básicos relacionados à PLN radio-guiada.....	105
8.5- ANEXO 5. Estudo Piloto.....	107
8.6- ANEXO 6. Acervo de Fotografias.....	115
8.6.1. Pesquisa de linfonodos.....	116
8.6.2. Iconografia Acessória.....	120
8.7- ANEXO 7. Estudo Histológico.....	127
8.8- ANEXO 8. Comparação de estudos na PLN (Modelos animais).....	131
8.9- ANEXO 9. Anatomia do aparelho digestivo do coelho.....	135
8.10- ANEXO 10. Produção científica relacionada à tese	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AzP	Azul Patente V [®] (<i>Guerbet</i>) 2,5% (25 mg / ml)
BG	<i>Background</i> (Radioatividade do fundo)
cps	Número de contagens por um segundo de radioatividade aferida pelo Europrobe [®] em 5 a 10 segundos
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
<i>gamma probe</i>	Detector manual portátil de radiação gama
CCI	Coeficiente de correlação intraclasses
DP	Desvio Padrão
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo
H-E	Hematoxilina-eosina
IM	Intramuscular
LN	Linfonodo (s) confirmado (s) histologicamente
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP
LTCCE	Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
mCi	Millicurie
MBq	Megabecquerel
min	Minutos
mm	Milímetro (s)
N	Número de animais considerado (Amostra)
N ^o .	Número de
nm	Nanômetros

OBS.	Observação
PLN	Pesquisa de linfonodo (s)
P.T.	Passa o teste
PX	Ponto X
RM	Radiomarcador (colóide ou carreador marcado com radioisótopo)
SL	Suspeita(s) de linfonodo(s) sem confirmação(ões) histológica(s)
TA	Presença de tecido adiposo
^{99m} Tc	tecnécio – 99m
Unicamp-SP	Universidade Estadual de Campinas – SP
µm	Micrometro

	PÁG.
Figura 1- Gaiola de plástico no LTCCE, onde os animais aguardavam antes de iniciar o experimento.....	45
Figura 2- Coelho em decúbito lateral após receber anestesia (IM)	46
Figura 3- Coelho anestesiado, com sonda orogástrica e contido pelos membros, sobre mesa cirúrgica.....	46
Figura 4- Visão aérea do animal, após completada a laparotomia mediana e posterior fixação do processo xifóide	47
Figura 5- Fotografias demonstrando o estômago e o baço durante o período intraoperatório, pouco antes da realização das punções e, posteriormente, na bancada, após a retirada dos órgãos “em bloco”	48
Figura 6- Realização de injeção com AzP na camada subserosa da parede gástrica (PX)	48
Figura 7- Apresentação da irrigação da parede anterior gástrica e localização do PX	49
Figura 8- Esquema demonstrando o estômago, para classificação topográfica das SL encontradas (Anexo 3)	104
Figura 9- Representação esquemática da localização dos pontos A, B e C (Anexo 5).	108
Figura 10- Fotografias, demonstrando injeções do RM e AzP (passo a passo), além da pesquisa de SL aos 10 minutos (Anexo 8.6.1)	116
Figura 11- Fotografia demonstrando LN fúndico periesofágico azul-radioativo, durante avaliação aos 20 minutos, após realização de pequena dissecação do mesmo, para melhor visualização (Anexo 8.6.1).....	117
Figura 12- Fotografias demonstrando avaliação com o <i>gamma probe</i> , durante avaliação aos 20 minutos (Anexo 8.6.1).....	118

Figura 13- Fotografia demonstrando avaliação “ <i>ex vivo</i> ” de linfonodo em bancada com sonda do <i>gamma probe</i> (Anexo 8.6.1).....	119
Figura 14- Mesa cirúrgica com instrumental pronto para iniciar o experimento (Anexo 8.6.2).....	120
Figura 15- Fotografia demonstrando na ponta da pinça a presença de membrana hepatogástrica delgada, transparente, identificada em todos os animais (Anexo 8.6.2).....	120
Figura 16- Fotografia demonstrando a visão frontal do <i>Europrobe</i> [®] e respectiva sonda (Anexo 8.6.2).....	121
Figura 17- Aparelho usado para aferir e calibrar a radiomarcagem do fitato de sódio com o ^{99m} Tc (Anexo 8.6.2).....	121
Figura 18- Fotografia demonstrando veia cava dissecada durante linfadenectomia pericaval (Anexo 8.6.2).....	122
Figura 19- Apresentação e particularidades metodológicas do Azul Patente V [®] (Guerbert) 2,5% e radiomarcador (fitato – ^{99m} Tc) (Anexo 8.6.2.).....	123
Figura 20- Fotografias demonstrando presença de acidentes de punção com pequena perda e espanhamento de RM/AzP no sítio da punção, mas sem prejuízo da avaliação das SL (Anexo 8.6.2).....	124
Figura 21- Fotografias demonstrando presença de acidentes de punção com grande espalhamento do RM/AzP no sítio da punção, prejudicando relativamente à avaliação das SL (Anexo 8.6.2).....	125
Figura 22- Fotografia com estômago aberto, em bancada, demonstrando presença de nódulo submucoso com fissura e consequente perfuração de parede gástrica, comprovada pelo tingimento do conteúdo gástrico com AzP (Anexo 8.6.2).	126
Figura 23- Demonstração de linfonodo azul dissecado de 0,3 cm, sendo aferido com régua milimetrada, sobre uma gaze (Anexo 8.6.2).....	126
Figura 24- Lâmina com SL encaminhada para estudo histológico com H-E, demonstrando a presença de três linfonodos e fragmento de tecido pancreático (Anexo 7).....	128

Figura 25- Lâmina de estudo histológico (H-E), demonstrando constituintes de um linfonodo, através de aumento igual a 400X (Anexo 7).....	129
Figura 26- Anatomia do aparelho digestivo do coelho (Anexo 9).....	136

Tabela 1-	Resultados da detecção de linfonodos gástricos (confirmados histologicamente) de acordo com o método usado.....	55
Tabela 2-	Análise da detecção de linfonodos gástricos (confirmados histologicamente) de acordo com o método usado em 29 animais, não considerando os 3 animais com intercorrências que impossibilitaram adequada PLN.....	56
Tabela 3-	Concordância entre os métodos de PLN gástricos em cada avaliação por tempo, dada pelo coeficiente de correlação intraclasses.....	56
Tabela 4-	Distribuição topográfica dos linfonodos identificados por PLN por meio de métodos combinados com confirmação histológica.....	58
Tabela 5-	Identificação das primeiras suspeitas de linfonodos e linfonodos sentinelas, segundo tempo da avaliação.....	59
Tabela 6-	Análise descritiva e comparativa da quantidade de radioatividade em cps, apresentada pelo primeiro linfonodo radioativo identificado, segundo tempo da avaliação.....	61

LISTA DE QUADROS E GRÁFICO

	PÁG.
Quadro 1- Intercorrências durante o estudo, segundo tempo do experimento	54
Gráfico 1- Distribuição da identificação das SL na avaliação com o <i>gamma probe</i> aos 5, 10 e >20 min, durante PLN gástrico em comparação com a confirmação histológica	57
Quadro 2- Distribuição dos coelhos segundo jejum para alimentos, ponto de injeção do RM + AzP e tipo da solução do corante injetada (Anexo 5)	109
Quadro 3- Características do Carvão Ativado PA (Anexo 5)	110
Quadro 4- Distribuição dos coelhos segundo quantidade de SL identificadas no período intraoperatório com sua posterior confirmação histológica, assim como a descrição de possíveis acidentes ocorridos durante a punção do RM e corante na parede gástrica (Anexo 5)	111
Quadro 5- Comparação de estudos para criação e padronização de modelo animal experimental para pesquisa de linfonodos em estômago (Anexo 8).....	132

RESUMO

Introdução - Com os estudos de Gould *et al.* (1960), Cabanas (1977) e Morton *et al.* (1992), estabeleceu-se o conceito da pesquisa do linfonodo sentinela. Esse se baseia na teoria de que ao identificar a presença ou ausência de metástase no primeiro linfonodo que recebe a drenagem linfática a partir do tumor (sentinela), poderia representar o estado de acometimento dos outros linfonodos. Isto evitaria a realização desnecessária de linfadenectomias. Com o passar dos anos, foi consagrada para ser aplicada em casos de melanoma e câncer de mama. Nesta última década, tenta-se estender os princípios da utilização da pesquisa de linfonodo sentinela para os cânceres do aparelho digestivo. Entretanto, no caso do estômago, existem algumas dificuldades, como: presença de sistema de drenagem linfática multidirecional, ocorrência de metástases saltatórias e identificação de mais de um linfonodo sentinela por indivíduo. **Objetivo** - Criar e padronizar um modelo animal para o treinamento de pesquisa de linfonodos sentinelas em estômago. **Método** - Trinta e dois coelhos, saudáveis, foram submetidos à anestesia exclusivamente intramuscular. Por meio de laparotomia, foi injetado na subserosa da parede anterior do corpo gástrico, 0,1 ml de fitato marcado com tecnécio-99m (0,2 mCi), em seguida pelo mesmo orifício, de 0,2 ml de Azul Patente V[®] 2,5%. A cavidade abdominal foi avaliada, “*in vivo*”, para pesquisa de suspeitas de linfonodos azuis (corados em azul) e com detector manual de radiação gamma aos 5, 10 e 20 minutos para detecção de suspeitas de linfonodos radioativos (radioatividade identificada superior a 10X o valor apresentado pelo fundo). Após 20 minutos, realizou-se ressecção e exérese total do estômago, baço e suspeitas de linfonodos, para posterior avaliação da radioatividade “*ex vivo*”. A seguir, encaminharam-se as suspeitas de linfonodos para estudo histológico para identificação de tecido linfóide. **Resultados** - Foram identificados linfonodos em 30 coelhos (93,75%) com média de 2,2 por animal. Das 90 suspeitas de linfonodos detectadas, em 70 casos (77,77%) obteve-se confirmação histológica para tecido linfóide. Dessas, a maioria foi identificada e localizada na região entre o esôfago e o fundo gástrico durante a avaliação “*in vivo*” aos 5 minutos. Dois coelhos faleceram durante os experimentos (Taxa de mortalidade = 6,25%). **Conclusão** - O modelo experimental em coelhos para pesquisa de linfonodos sentinelas em estômago por métodos combinados foi factível, de fácil execução e baixa mortalidade, podendo ser usado para treinamento.

ABSTRACT

Introduction - The concept of sentinel lymph node was established by the studies of Gould et al. (1960), Cabanas (1977) and Morton et al. (1992). It is based on the theory that, whenever the presence or absence of metastasis is identified in the first lymph node that receives the lymphatic drainage from the tumor (sentinel) the status of involvement of other lymph nodes might be inferred. This could avoid the performance of unnecessary lymphadenectomies. Over the years, its use was consecrated by its application in melanoma and breast cancer. In the last decade, attempts have been made to extend the principles of sentinel lymph node investigation to cancers of the digestive tract. In the case of stomach cancer, additional difficulties were found, such as multiple and aberrant lymphatic routes, the occurrence of skip metastasis and the possible identification of more than one sentinel lymph node in the same patient. **Aim** - To develop and evaluate an animal model for training sentinel lymph node navigation in the stomach. **Methods** - Thirty-two healthy rabbits, were prepped and given intramuscular anesthesia. Through a formal laparotomy, they received a subserosal injection of 0.1 ml of phytate labeled with technetium-99m (0.2 mCi) in the anterior wall of the gastric corpus, followed by 0.2 ml of Blue Patent[®] V 2.5%, through the same puncture site. Suspicious lymph nodes were searched *in-vivo* at 5, 10 and 20 minutes, both visually (Blue Patent stained lymph nodes) and with a manual *gamma* radiation detector (to detect suspected radioactive lymph nodes, displaying radioactivity levels over 10X the value displayed by the background). En-block resection of the stomach, spleen, visible lymph nodes and local fat tissue was then performed and the specimen was assessed "*ex vivo*" for radioactivity. Suspected lymph nodes were sent for histological study to evaluate the presence of lymphoid tissue. **Results** – Radio-labeled or stained lymph nodes were identified in 30 rabbits (93.75%) with an average of 2.2 specimens per animal; of the 90 suspicious lymph nodes detected, histology confirmed lymphoid tissue in 70 cases (77.77%). Most lymph nodes were identified at the 5-minute *in-vivo* evaluation and their most common location was found to be in the region between the esophagus and the gastric fundus. Two rabbits died during the procedure resulting in a 6.25% mortality. **Conclusion** - The rabbit model proved adequate for training in sentinel node navigation in the stomach by combined methods (dye and radiocolloid) being easy to execute and associated with low mortality.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Considerações Gerais

Sempre foi constante na ciência da cirurgia a busca por técnicas operatórias menos invasivas, capazes de gerar melhor sobrevida aos pacientes portadores de câncer, sem perder a eficiência oncológica.

Classicamente há quase um século, Moynihan (1908) declarou que a cirurgia para o tratamento de neoplasias malignas seria fundamentada na anatomia do sistema linfático. Mais tarde, com Gould et al. (1960), o conceito anatômico do linfonodo sentinela foi descrito pela primeira vez para neoplasias malignas da parótida, sendo reforçado, posteriormente, pelas descobertas de Cabanas (1977) relacionadas ao câncer peniano. Depois, Morton et al. (1992), concretizaram a identificação funcional do linfonodo sentinela, por meio de método por corante utilizado em casos de melanoma.

A descrição da pesquisa de linfonodos (PLN) sentinelas, baseada nas descobertas desses autores, fundamenta-se em dois princípios básicos: a existência de um padrão ordenado e previsível de drenagem linfática para uma rede de linfonodos regionais e no funcionamento de um primeiro linfonodo como filtro eficaz para as células neoplásicas (TANIS et al., 2001; CHEN et al., 2006). Assim, objetiva identificar a presença ou ausência de metástase no linfonodo denominado de sentinela, ou seja, aquele que recebe primeiramente a drenagem linfática a partir da lesão anaplásica, refletindo o estado de acometimento dos outros linfonodos (MORTON et al., 1992; CHEN et al., 2006; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007).

Ela pode ser realizada através de métodos por injeção pré ou intraoperatória de corante e/ou radiomarcador com ou sem avaliação linfocintilográfica prévia (filmes gerados a partir de captadores de imagem em câmaras de cintilação ou com auxílio de tomografia por emissão de pósitrons) e auxílio de avaliação intraoperatória guiada por detector manual portátil de radiação gama (*gamma probe*) (MORTON et al., 1992, ALEX e KRAG, 1993; KITAGAWA et al., 2000; TANIS et al., 2001; COCHRAN et al., 2003; BUSCOMBE et al., 2004; SAPIENZA et al., 2004; CHEN et al., 2006; LOPES et al., 2006; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007; OZMEN et al., 2008); ou por meio de métodos pós-operatórios (MÄRKLE et al., 2009; MÄRKLE et al., 2011).

Em consequência, sua realização poder-se-ia evitar a morbidade relacionada à realização de grandes ressecções e linfadenectomias caso comprovada a ausência de metástase no linfonodo sentinela (COCHRAN et al., 2003; GIPPONI et al., 2004; CHEN et al., 2006), além de melhorar a precisão do estadiamento linfonodal (CHEN et al., 2006).

Com o passar dos anos, a pesquisa de linfonodo (PLN) sentinela foi expandida e consagrada para utilização nos casos de melanoma (MORTON et al., 1992; TANIS et al., 2001; TAVARES et al. 2001; HAYASHI et al., 2003; CHEN et al., 2006; LOPES et al., 2006; ALVES, 2007) e câncer de mama (GIULIANO et al. 1994; VERONESI et al., 1997; TAVARES et al. 2001; HAYASHI et al., 2003; CHEN, 2006; LOPES et al., 2006; VERONESI et al., 2010).

Recentemente, a PLN sentinela vem sendo realizada também em outras neoplasias: do sistema genito-urinário (COCHRAN et al., 2003; GIPPONI et al., 2004; CHEN et al., 2006), da cabeça e pescoço (GIPPONI et al., 2004; CHEN et al., 2006), ginecológicas (TAVARES et al. 2001; COCHRAN et al., 2003; GIPPONI et al., 2004; CHEN et al., 2006), do pulmão (GIPPONI et al., 2004; CHEN et al., 2006), outros cânceres de pele (CHEN et al., 2006) e do aparelho digestivo (KITAGAWA et al., 2000; CHEN et al., 2006; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007; FREITAS et al., 2008; ONZMEN et al., 2008; COBURN, 2009).

Entretanto, diferentemente do câncer de mama e melanoma, permanecem controvérsias a respeito do emprego da PLN sentinela para outras neoplasias malignas. Particularmente relacionado aos cânceres gastrointestinais, os cirurgiões permanecem céticos à respeito da sua confiabilidade, especialmente devido à alta incidência de metástases saltatórias, ou seja, quando a metástase poupa os linfonodos regionais e atinge, “salta”, para outros, pertencentes às cadeias linfáticas secundárias ou terciárias, além da ocorrência de resultados falso-negativos relacionados aos estudos histológicos para comprovação da presença das metástases e ocorrência de mais de um linfonodo sentinela (KITAGAWA et al., 2000; COCHRAN et al., 2003; GIPPONI et al., 2004; KITAGAWA et al., 2005a; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007; COBURN, 2009).

Neste contexto, urge a necessidade da realização de estudos relacionados ao desenvolvimento e padronização da PLN sentinela em cânceres gastrointestinais, assim como, de criar modelos experimentais para treinamento de cirurgiões, objetivando diminuir as dificuldades, particularmente, relacionadas à curva de aprendizagem do método.

1.2 – Câncer Gástrico Precoce e a Linfadenectomia

Apesar da incidência da neoplasia maligna de estômago estar diminuindo, especialmente nos países desenvolvidos, ainda permanece como o segundo câncer mais letal no mundo (WHO, 2011), com estimativas nacionais para ocorrência de 21500 casos novos em 2010 (INCA, 2010).

Recentemente, apesar do aumento da acurácia no estadiamento pré-operatório do câncer gástrico com os avanços ocorridos com as técnicas diagnósticas, como com a tomografia computadorizada e por emissão de pósitrons, ultrassonografia endoscópica e ressonância nuclear magnética (NOH et al., 2005; KWEE e KWEE, 2009; OTT et al., 2008; COBURN, 2009), ainda, não é possível prever o estadiamento linfonodal em todos os casos (ZULFIKAROGU et al., 2005; KWEE e KWEE 2009; AKAGI et al., 2011).

Porém, fruto disso, cresceu a frequência de diagnóstico do câncer gástrico em sua forma precoce (NOH et al., 2005), ou seja, aquela lesão confinada à mucosa ou submucosa do órgão sem considerar a presença de metástases linfáticas (YAMAGUCHI et al., 2001; KWEE e KWEE, 2008; AKAGI et al., 2011).

Até poucos anos atrás, permanecia inquestionável a realização de gastrectomia acompanhada de grandes linfadenectomias, particularmente a D2, para o tratamento padrão do câncer gástrico (JGCA, 1998; MARUYAMA et al., 1999; GOTODA et al., 2000; CHEN et al., 2006; SHI e ZHOU, 2010; JGCA, 2011; SAKA et al., 2011).

Essas linfadenectomias deveriam objetivar a dissecação e isolamento de no mínimo 15 linfonodos, mesmo em casos de câncer gástrico precoce (MCLOUGHLIN, 2004; COBURN 2009; SHI e ZHOU, 2010).

Entretanto, apesar do estado linfonodal ser o principal fator preditivo de prognóstico para o paciente com câncer gástrico (CHEN et al., 2006; SAITO et al. 2007; OZMEN et al., 2008; COBURN, 2009; AKAGI et al., 2011), muito se questiona sobre a real necessidade da realização de extensas linfadenectomias.

Isso ocorre, pois no caso de cânceres limitados somente à mucosa gástrica o risco de metástases seria reduzido, ou seja, entre 2 a 3% (GOTODA et al., 2000; CHEN et al., 2006; OZMEN et al., 2008), além da existência de maior morbimortalidade e menor qualidade de vida pós-cirúrgica relacionada à realização das linfadenectomias (GOTODA et al., 2000; NOH et al., 2005; ZULFIKAROGLU et al., 2005; MCCULLOCH et al., 2005).

Entretanto, devido ao alto risco de metástases saltatórias, 15 a 20% dos casos (TANGOKU et al., 2007) e confiabilidade questionável dos estudos histológicos para a identificação de metástases propriamente dita e micrometástases (KARUBE et al., 2004; AIKOU et al., 2006; MIYAKE et al., 2006; YANAGITA et al., 2008a; YANAGITA et al., 2008b; FUKAGAWA et al., 2010), torna-se imperativo procurar algum método capaz de determinar o estadiamento linfonodal com maior confiabilidade.

Com isso, será possível utilizar técnicas de cirurgia menos invasiva, mantendo-se a segurança oncológica (NOH et al., 2005).

Assim, apresenta-se a PLN sentinela em câncer gástrico precoce como talvez uma solução para o problema.

1.3 – Pesquisa de Linfonodo Sentinela em Câncer Gástrico

Apesar da PLN sentinela estar padronizada e consolidada para utilização em casos de câncer de mama e melanoma, infelizmente, para o emprego no câncer gástrico precoce, existem alguns obstáculos a serem ultrapassados.

O primeiro obstáculo é a anatomo-fisiologia do sistema linfático gástrico. O estômago é um órgão constituído de um sistema de drenagem linfática multidirecional e complexo, formado por rotas aberrantes paciente-

específico (COCHRAN et al. 2003; KITAGAWA et al., 2005b; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007), com ductos linfáticos que facilmente podem apresentar obstrução por invasão tumoral (HIRATSUKA et al., 2001; COCHRAN et al. 2003; KITAGAWA et al., 2005a; KITAGAWA et al., 2005b; COBURN, 2009), além de apresentar a ocorrência de metástases saltatórias (ICHIKURA et al., 2002; COCHRAN et al. 2003; KITAGAWA et al., 2005b; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007; SAITO et al. 2007; KITAGAWA et al., 2005a; KITAGAWA et al., 2005b).

Ademais, é preciso lembrar que ao realizar-se a PLN sentinela, é possível identificar números variados de linfonodos sentinelas, média de 2 a 7 por paciente (HIRATSUKA et al., 2001; RYU et al., 2003; HAYASHI et al., 2003; MIWA et al., 2003; KIM et al., 2004; LEE et al., 2005; TANGOKU et al., 2007; BOFF et al., 2007).

O segundo obstáculo é a padronização da PLN sentinela. A depender do estudo, evidenciam-se variações quanto à forma de aplicação, calibre da agulha, local da injeção do corante ou radiomarcador (RM); tipo e quantidade dos mesmos; tamanho ideal da partícula do coloide (UENOSONO et al., 2003; HAYASHI et al., 2003; LEE et al., 2006), tempo de avaliação dos linfonodos sentinelas após aplicação do corante e tipo de método escolhido, ou seja, método isolado só por injeção de corante ou só por utilização de RM (pesquisa radioguiada) ou aplicação de ambos (métodos combinados).

A maioria dos estudos, com o intuito de aumentar a sensibilidade da PLN sentinela, utilizam métodos combinados (HAYASHI et al., 2003; KARUBE et al., 2004; CHENG et al., 2004; CHENG et al., 2005; ICHIKURA et al., 2006; KITAGAWA et al., 2006; LEE et al., 2006; AIKOU et al. 2006; TANGOKU et al., 2007; OZMEN et al., 2008; ICHIKURA, 2009; ICHIKURA et al., 2009).

Isso ocorre por meio de injeção na submucosa da parede gástrica em 4 pontos (um ponto em cada quadrante) peritumoral de RM composto por estanho coloidal mais tecnécio-99m (^{99m}Tc) (HAYASHI et al., 2003; KARUBE et al., 2004; KIM et al., 2004; UENOSONO et al., 2005; ICHIKURA et al., 2006; KITAGAWA et al., 2006; LEE et al., 2006; YANAGITA et al., 2008b; ICHIKURA et al., 2009) e um corante vital. Deste, os mais utilizados são o azul patente (HAYASHI et al., 2003; MIWA et al., 2003; KARUBE et al., 2004; MIYAKE et al.,

2006; ORSENIGO et al., 2008; OZMEN et al., 2008), o verde de indocianina (HIRATSUKA et al., 2001; ICHIKURA et al., 2006; OHDAIRA et al., 2007; ICHIKURA et al., 2009) e azul de isosulfan (TISIOULIAS et al., 2000; ISOZAKI et al., 2004; KITAGAWA et al., 2006; LEE et al. 2006; TANGOKU et al., 2007; OZMEN et al., 2008).

O terceiro obstáculo é a existência de dificuldades relacionadas à curva de aprendizagem. Estima-se que seja necessária a realização mínima de mais de 25 casos de dissecação e PLN sentinela para que se alcance experiência mínima e taxa de sucesso aceitável (COX et al., 1998; COCHRAN et al., 2003; TANGOKU et al., 2007; LEE et al., 2009).

O último, esta relacionado às dificuldades inerentes aos custos e sensibilidade dos métodos de identificação das metástases linfonodais.

A presença de resultados falso-negativos relacionados aos exames de congelação e hematoxilina-eosina (H-E) convencional, torna necessário a realização de exames com técnicas moleculares e/ou imunohistoquímica, particularmente para identificar as micrometástases (CHOI et al., 2002; KARUBE et al., 2004; AIKOU et al., 2006; MIYAKE et al., 2006; SAITO et al. 2007; TANGOKU et al., 2007; YANAGITA et al., 2008a; YANAGITA et al., 2008b; FUKAGAWA et al., 2010).

Apesar dos obstáculos apresentados, já existem iniciativas recentes em humanos que recomendam a realização da pesquisa de linfonodo sentinela em câncer gástrico precoce, com a finalidade de mudança de conduta, ou seja, indica-se ressecções gástricas limitadas e não se efetua a linfadenectomia padrão, quando os linfonodos sentinelas não apresentarem metástases propriamente ditas ou micrometástases (KITAGAWA e KITAJIMA 2004, KITAGAWA et al., 2005a; KITAGAWA et al., 2006; ICHIKURA et al., 2006; OHDAIRA et al., 2007; CHENG et al., 2008; ICHIKURA, 2009; ICHIKURA et al., 2009; KITAGAWA et al., 2009; BRAVO NETO et al., 2012).

Todavia, fundamentado em estudos como o de Claude Bernard (1865), posteriormente com o Código de Nurenberg (1947) e a Declaração de Helsinque (1975), não se aconselha que ocorra a experimentação em seres

humanos sem ter sido realizado estudos pregressos em animais (FAGUNDES e TAHA, 2004; SCHANAIDER e SILVA, 2004; CALASANS-MAIA et al, 2009).

Portanto, permanece a necessidade da criação de um modelo animal experimental factível para treinamento, desenvolvimento e padronização da PLN sentinela em câncer gástrico.

1.4 – Modelo Experimental de Treinamento em PLN sentinela

Atualmente, existem poucas iniciativas que apresentaram algum modelo experimental animal para treinamento em PLN sentinela em estômago.

Duas iniciativas brasileiras apresentaram um modelo canino de PLN sentinela em estômago com injeção exclusiva de corante em parede de antro gástrico em cadelas (RIBEIRO FILHO et al., 2008; TORRES de MELO, 2010).

Outra, coreana, utilizou a injeção de nanopartículas magnéticas fluorescentes na parede do estômago de coelhos e identificou os linfonodos por um sistema computadorizado (KIM et al., 2008).

Por fim, apresenta-se a iniciativa americana, que injetou, via endoscopia digestiva alta, na camada submucosa da parede gástrica de suínos, o ácido manosil dietileno dextran associado ao ^{99m}Tc (MÉNDEZ et al., 2003).

Por conseguinte, para estabelecer um modelo animal experimental ideal e viável é preciso levar em consideração algumas características próprias dos animais a serem utilizados, como: custo, hábitos, facilidade de manejo, adaptação ao ambiente experimental, resistência a doenças, ciclo reprodutivo curto, menor apelo sentimental humanístico, particularidades anatômico-fisiológicas e semelhanças em relação aos seres humanos (BENSLEY e CRAIGIE, 1948; PIASECKI e WYATT, 1986; GHOSHAL e BAL, 1989; REILLY, 1998; ZHONG et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001; HARCOURT-BROWN, 2002; DAVIES e DAVIES 2003; FAGUNDES e TAHA, 2004; SCHANAIDER e SILVA, 2004; HRISTOV et al., 2006; CALASANS-MAIA et al, 2009; JOHNSON-DELANEY, 2006; LAPCHIK et al., 2009; BALBINOTTO et al., 2010;

RODRÍGUES-ALARCÓN et al., 2010; LVMA, 2011; ALVES et al., 2011; MEREDITH e JEPSON).

Assim, pretendeu-se desenvolver um modelo animal experimental com características que contemplem: baixo custo, fácil manejo, ciclo reprodutivo curto, pouco apelo sentimental, boa adaptação ao ambiente laboratorial, para ser utilizado na pesquisa de linfonodos gástricos através do uso de métodos combinados (utilização de corante e pesquisa radio-guiada).

Isso visa possibilitar inferência de conhecimentos teóricos e práticos, para servir como futuro modelo de treinamento para cirurgiões que objetivarem a realização da PLN sentinela em estômago, auxiliando a romper a barreira inerente à curva de aprendizagem, além de possibilitar a pesquisa de outras técnicas, corantes e radiomarcadores.

2 - OBJETIVO

Padronizar um modelo animal experimental em coelhos, para treinamento da pesquisa de linfonodos sentinelas no estômago, destacando suas características.

3 – MATERIAL E MÉTODO

3.1 – Considerações iniciais e caracterização da amostra

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (LTCCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas – SP (Unicamp – SP) (Anexo 1) e recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Unicamp – SP (sob número de protocolo 2033-1) e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal em 18 de novembro de 2009 (Anexo 2).

Foram selecionados aleatoriamente trinta e dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da linhagem Nova Zelândia, sexos masculinos, saudáveis, com faixa etária variando entre 3 e 5,5 meses e peso corpóreo entre 3000 e 4200 gramas, sob períodos variados de jejum pré-operatório.

Os animais foram fornecidos por um único criador (Granja Grota Azul – Campinas / SP), com padrões de criação sanitários convencionais, ciclo luz/escurecimento de 12 horas, quantidade de ingestão de ração igual a 140 gramas/dia/animal e água *ad libitum*; além de serem criados em gaiolas unitárias, de malha galvanizada, com dimensões de 50x45x40 cm e fundo fenestrado.

O estudo foi realizado em datas programadas quinzenalmente, sendo os coelhos entregues pelo fornecedor na manhã do estudo.

Em média, realizava-se a pesquisa de linfonodos gástricos em até três animais por período matutino, visto a preocupação com a queda da radioatividade apresentada pelo RM com o passar do tempo.

No LTCCE - FCM/Unicamp-SP, os animais permaneciam em gaiolas de plástico (nas laterais e fundo) e galvanizadas (teto), com dimensões de 60x50x30 cm, em ambiente com luz reduzida (por meio de semicobertura com pano), silencioso, com temperatura ambiente aproximada de 20 a 28°C, enquanto aguardavam para serem submetidos ao experimento (Figura 1).



O custo para a aquisição dos animais foi devidamente registrado.

Para determinação do local da injeção do corante e do RM no estômago dos animais, assim como, respectivas quantidades, foi realizado primeiramente um estudo piloto com 8 coelhos (Anexo 5).

3.2 – Anestesia

Os animais foram pegos unitariamente de forma adequada (CALASANS-MAIA et al, 2009; LAPCHIK et al., 2009, ALVES et al., 2011), para dar início a anestesia via exclusivamente intramuscular (IM) com cloridrato de quetamina (30 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (3 mg/Kg) (Figura 2). Além disso, realizou-se infiltração com 10 ml de lidocaína a 1% no local da incisão na parede abdominal.

Foi puncionado acesso venoso periférico em veia marginal da orelha, com agulha tipo *Butterfly* nº 21 a 23, para realização de hidratação intravenosa com soro fisiológico, durante o período intraoperatório.



Figura 2. Coelho em decúbito lateral após receber anestesia (IM).

Posteriormente, passava-se uma sonda de Levine via orogástrica (nº12), para descompressão do estômago, e os animais eram contidos com amarraduras, em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica (Figura 3).



Figura 3. Coelho anestesiado, com sonda orogástrica e contido pelos membros, sobre mesa cirúrgica.

3.3 – Experimento - Pesquisa de linfonodos

Realizou-se laparotomia mediana xifotransumbilical com fixação cranial do processo xifóide com ponto simples em “U” com fio de algodão 2.0, segundo ALVES et al. (2011) (Figura 4).

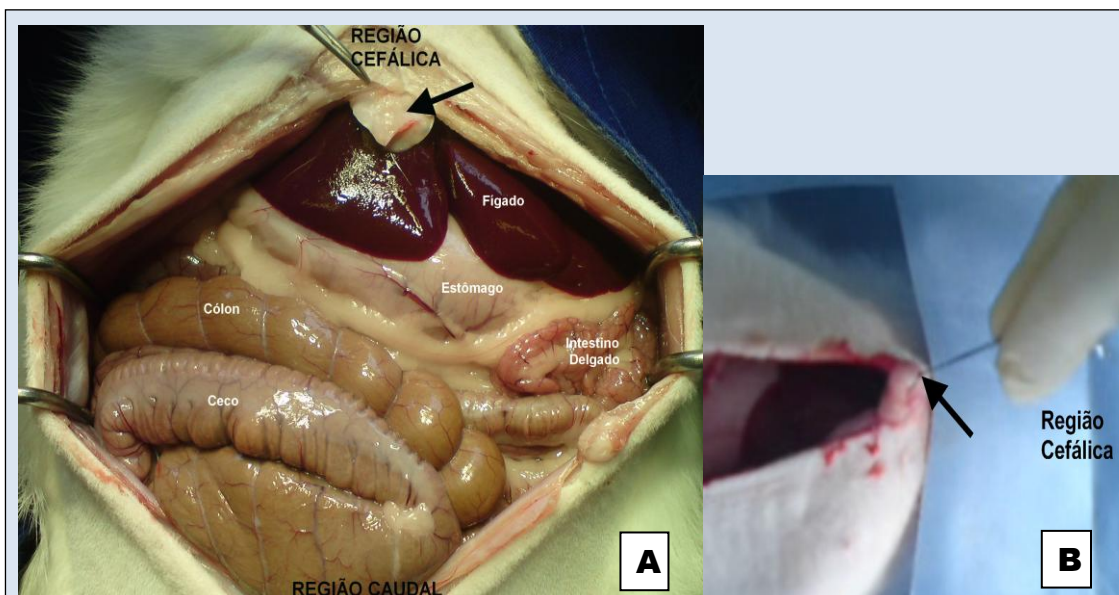


Figura 4. Visão aérea do animal, após completada a laparotomia mediana e posterior fixação do processo xifóide. **Legenda:** **4A.** Visão pós laparotomia mediana. Seta preta = Aponta para o processo xifóide. **4B.** Demonstração do processo xifóide fixado a parede torácica com um ponto em U (ALVES et al, 2011). Seta Preta: Local da fixação do xifóide por meio da realização de ponto tipo “U” com fio de algodão 2.0.

Efetuuou-se diérese da membrana transparente hepatogástrica (Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 15) e posteriormente síntese de dois pontos separados com fio de algodão 2.0 na grande curvatura gástrica para reparo e tração do órgão (Figura 5A) (ALVES et al., 2011).

Isso facilitava a manipulação delicada do estômago durante as avaliações com o *gamma probe*, Europrobe® (Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 16).

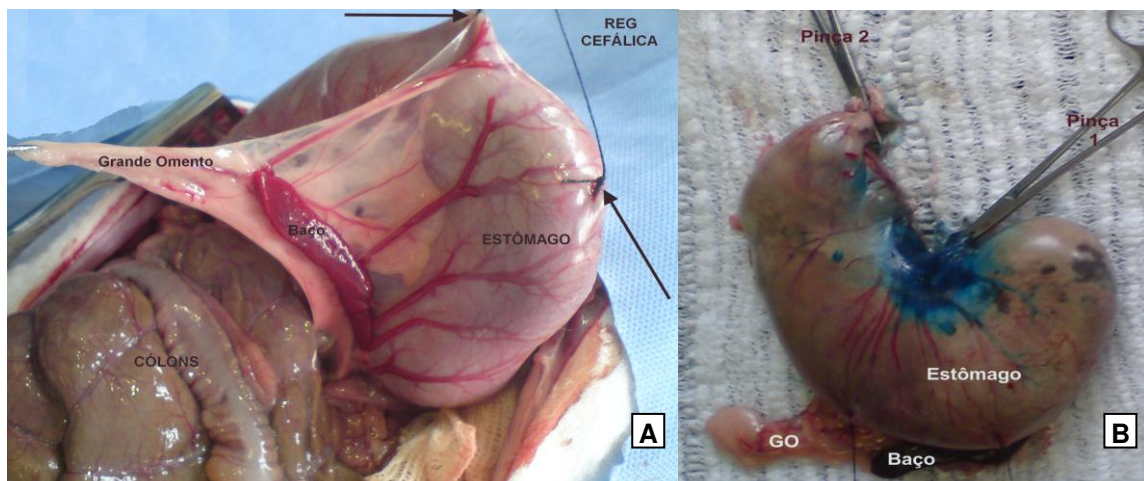


Figura 5. Fotografias demonstrando o estômago e o baço durante o período intraoperatório, pouco antes da realização das punções e, posteriormente, na bancada, após a retirada dos órgãos “em bloco”. **Legenda:** Foto A. Demonstra estômago sendo tracionado pelos pontos com fio de algodão 2.0 e o grande omento, sendo tracionado por uma pinça anatômica. REG = Região. Foto B. Demonstra o produto da gastrectomia + esplenectomia totais. GO = Grande omento; Pinça 1 = Esta clipando coto esofágico; Pinça 2 = Esta clipando o coto duodenal.

Em seguida, introduziu-se 0,5 cm da agulha, tipo insulina (26 gauge), no interior da camada subserosa da parede gástrica (Figura 6), especificamente no ponto X (PX) (Figura 7). Neste, injetou-se 0,1 ml de RM, constituído por fitato de sódio marcado com o radioisótopo, tecnécio – 99m, na dose de 7,4 MBq (Megabecquerel), ou 0,2 mCi (Millicurie) e em sequência, pelo mesmo orifício, 0,2 ml do corante vital, Azul patente V® (*Guerbet*) a 2,5 % (AzP) (Anexo 6 - 8.6.1 – Figura 10; Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 19).

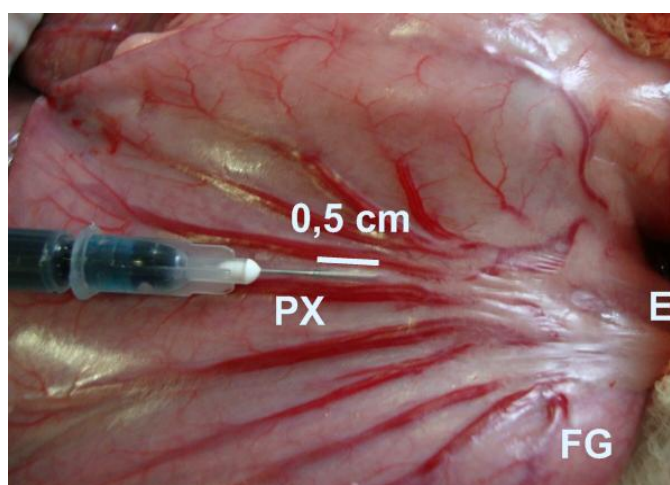


Figura 6. Realização de injeção com AzP na camada subserosa de parede gástrica (PX)

Legenda: E = Esófago; FG = Fundo gástrico.

O RM utilizado foi extraído do *Kit*, fornecido pelo IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo-SP), contendo 20 mg de fitato e 1 mg de cloreto estanoso diidratado. Esse Kit foi marcado com uma atividade de 1110 MBq (30 mCi) de ^{99m}Tc contida num volume de 3 ml da solução eluída de um gerador de ^{99m}Tc , também fornecido pelo IPEN (IPEN, 2011).

Depois, foi retirada do Kit marcado, a dose de 7,4 MBq (0,2 mCi) de fitato- ^{99m}Tc , a qual foi diluída com cloreto de sódio de sódio a 0,9% até atingir o volume de 0,1 ml, constituindo uma dose para um animal (Anexo 6 - 8.6.2. Figura 17 e Figura 19).

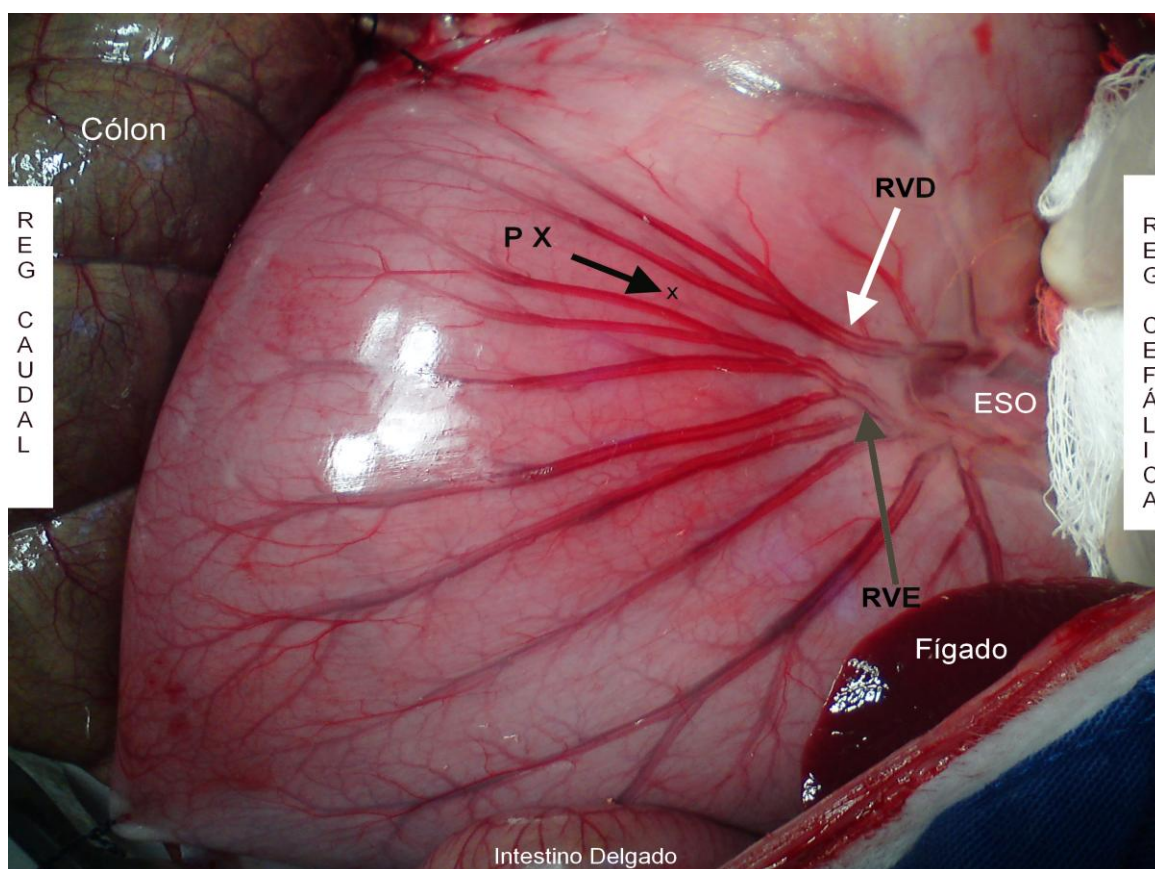


Figura 7. Apresentação da irrigação da parede anterior gástrica e localização do PX.

Legenda: REG = Região; ESO = Esôfago; RVD = Ramo ventral (anterior) direito da artéria gástrica esquerda; RVE = Ramo ventral (anterior) esquerdo da artéria gástrica esquerda; P X = Ponto X.

OBS.(Observação): O PX localizava-se na parede anterior do corpo gástrico a 3,5 cm da pequena curvatura na região entre os dois ramos ventrais da artéria gástrica esquerda (BENSLEY e CRAIGIE, 1948).

Procedeu-se com avaliação “*in vivo*” do interior da cavidade abdominal com o *gamma probe*, com o objetivo de procurar SL (suspeitas de

linfonodos) aos 5, 10 e 20 minutos, depois da injeção do RM e AzP (Anexo 6 - 8.6.1 – Figura 12).

As SL foram classificadas em: só azul, ou seja, espécimes corados por respectiva cor, acompanhado de radioatividade inferior a 10 vezes o BG (*Background* – Radioatividade de fundo); só radioativa, ou seja, não coradas, mas com contagem de radioatividade superior a 10 vezes o BG e azul-radioativa, aquelas que assumiam ambas as condições.

O BG da cavidade abdominal foi medido com o *gamma probe* no final do procedimento cirúrgico na região correspondente à localização prévia do estômago. Desse modo, evitou-se que a radioatividade proveniente do sítio de injeção ou de estruturas com captação fisiológica do radiofármaco interferisse na medida do mesmo.

Ainda, as SL foram subclassificadas conforme localização anatômica (Anexo 3 - Figura 8).

Após a pesquisa radioguiada aos 20 min, foi realizado a dissecação e exérese das SL (Anexo 6 – 8.6.1 – Figura 11).

Ao final da dissecação das SL foi praticada a eutanásia dos animais, complementação da dissecação das mesmas, gastrectomia, esplenectomia e omentectomia, em bloco, conforme técnica padrão.

A eutanásia foi realizada com aprofundamento do plano anestésico por meio de sobredose de Tiopental Sódico 25 mg/ml via intravenosa e posterior injeção com 10 ml de cloreto de potássio a 19,1%.

Por último, avaliava-se a radioatividade “*ex vivo*” apresentada pelas mesmas estruturas avaliadas “*in vivo*”, além do conteúdo gástrico (Anexo 6 – 8.6.1 - Figura 13).

3.4 – Técnica padrão do procedimento cirúrgico (gastrectomia e esplenectomia)

Após a linfadenectomia inicial das SL e eutanásia dos animais, realizou-se a gastrectomia e esplenectomia da seguinte forma: 1º Isolamento e diérese de esôfago abdominal (com retirada simultânea da sonda de Levine);

2º Clampeamento com pinças hemostáticas e diérese dos vasos que irrigam baço e grande curvatura; 3º Clampeamento com pinças hemostáticas e diérese dos vasos que irrigam pequena curvatura; 4º Dissecção, isolamento e ligadura do intestino delgado justa pilórico com diérese deste e retirada do estômago associado ao grande omento, em bloco, juntamente com baço (Figura 5B).

3.5 – Estudo histológico

As SL ressecadas devidamente identificadas foram fixadas em formalina tamponada a 10% por, pelo menos, 12 horas. Posteriormente, foram incluídas em parafina, cortadas com espessura de 6 µm (micrômetros) e coradas em hematoxilina-eosina (Anexo 7 – Figuras 24 e 25). Caso o espécime apresentasse dimensões inferiores a 6 µm, era submetido a um corte único no seu maior eixo.

Por meio de microscopia óptica convencional o patologista pesquisou a presença de tecido linfóide (Anexo 7 – Figura 25).

Obs.: Foi considerado, neste estudo, como SL ou linfonodos (suspeitas de linfonodos confirmadas histologicamente como sendo tecido linfóide) sentinelas, as primeiras estruturas identificadas na avaliação por corante ou pesquisa radioguiada.

3.6 – Análise estatística

Foi utilizada para comparação das variáveis avaliadas, a ferramenta estatística ANOVA para as medidas repetidas (MONTGOMERY, 1991). A transformação por postos foi aplicada às medidas devido à variabilidade e para a comparação dessas, também foi utilizado o teste de Wilcoxon para as amostras relacionadas (CONOVER, 1971).

Para verificar a concordância entre os métodos foi utilizado o coeficiente de correlação intraclasses (CCI) (LANDIS e KOCH, 1977). Este varia de -1 a 1, sendo os valores próximos dos extremos indicativos de maior grau de correlação negativa ou positiva, respectivamente, além dos valores próximos a 0 representarem a não existência de correlação.

Segundo Mitra e Lankford (1999), quando o CCI apresentar valores entre 0,20 e 0,40 terá correlação entre as variáveis baixa; quando entre 0,40 e 0,60 terá correlação moderada; e quando maior que 0,60 terá alta correlação. Os valores positivos deste coeficiente indicarão relação linear direta, ou seja, à medida que uma variável aumentar a outra também aumentará e coeficientes negativos indicarão relação inversa, ou seja, quando uma variável aumentar a outra diminuirá ou reciprocamente (MITRA e LANKFORD, 1999; LIRA e CHAVES NETO, 2006).

Os cálculos estatísticos foram realizados com auxílio dos softwares *Microsoft Excel 2002*, *SPSS 15.0 for Windows Evaluation Version* e *SAS System for Windows 9.2*.

O nível de significância estatístico adotado neste estudo foi de $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Amostra, intercorrências e custo

A amostra constitui-se de 32 coelhos adultos jovens, com idade média de 4,6 meses. Destes, dezenove animais (59,37%) apresentaram idade igual ou inferior a 138 dias.

O peso corpóreo médio dos animais foi de 3407,81 gramas (Desvio padrão = +/- 331,6). Não existiu diferença estatisticamente significativa entre o peso corpóreo dos animais com idade inferior e superior a 138 dias (ALVES et al., 2012).

Durante o estudo, ocorreram 20 intercorrências, sendo que 15% impossibilitaram a PLN gástricos em todos os tempos das avaliações (Quadro 1).

Quadro 1. Intercorrências durante o estudo, segundo tempo do experimento.

TEMPO DO EXPERIMENTO INTERCORRÊNCIAS	Anes- tesia	Laparo- tomia	Punção do RM e AzP	5 min	10 min	Dissecção das SL
NÃO INTERFERIRAM NA PLN						
Animal agitou (chiou)*	1					
Lesão de serosa de parede gástrica*		1				
Pneumotórax		2				
Pequeno espalhamento do RM/AzP no sítio da punção (Anexo 6 - 8.6.2 – Fig. 20)			5			
Extravazamento do RM/AzP após compressão local				1		
Pequena hemorragia durante dissecção de suspeita de linfonodo pericaval						1
INTERFERIRAM POUCO NA PLN						
Perfuração de parede gástrica**(Anexo 6 - 8.6.2 – Fig. 22)			3			
Grande espalhamento do AzP no sítio da punção (Anexo 6 - 8.6.2 – Fig. 21)			3			
IMPOSSIBILITARAM A COMPLETA PLN						
Óbito					1	1
Perda e contaminação grosseira da cavidade abdominal com RM			1			
TOTAL	1	3	12	1	1	2

Legenda: PLN = Pesquisa de linfonodos; RM = Radiomarcador; AzP = Azul Patente; SL = Suspeitas de linfonodos; Min = minutos; * = Essas intercorrências ocorreram em um mesmo animal, estando relacionadas em causalidade, visto que os chiados geraram distensão gástrica, favorecendo a lesão desse órgão durante a laparotomia; ** = Nesses 3 casos comprovou-se a perfuração gástrica após aferido a quantidade média de radioatividade apresentada pelo conteúdo gástrico, respectivamente, 616 cps, 460 cps e 220 cps; cps = Número de contagens por um segundo de radioatividade aferida pelo Europrobe® em 5 a 10 segundos (HAYASHI et al., 2003).

A taxa de mortalidade no estudo foi igual a 6,25% (2 casos). Destes, um ocorreu durante avaliação da cavidade abdominal aos 10 minutos, devido

parada respiratória por sobredosagem de anestésicos e o outro, por lesão da veia cava durante a dissecação de uma SL pericaval (Quadro 1 e Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 18).

O custo médio para compra de um coelho foi de 12,00 reais por quilograma de peso corpóreo.

4.2 – Identificação dos linfonodos

Nos 32 coelhos, foram identificados linfonodos com os métodos combinados de pesquisa de linfonodos (PLN) gástricos em 30 casos (93,75%), com média de 2,19 linfonodos encontrados por animal (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da detecção de linfonodos gástricos (confirmados histologicamente) de acordo com o método usado

Variáveis	Método de detecção do linfonodo		
	Corante	RM	Combinados
Nº animais em que o LN foi identificado (%)	30 (93,75%)	27 (84,37%)	30 (93,75%)
Média do Nº de LN identificados por An (DP+/-)	2,06 (1,39)	1,66 (1,31)	2,19 (1,35)
Sensibilidade (%)	66/70 (94,3%)	53/70 (75,7%)	70/70 (100%)
Valor preditivo positivo (%)	66/86 (76,7%)	53/66 (80,3%)	70/90 (77,7%)
Acurácia (%)	66/90 (73,3%)	60/90 (66,6%)	70/90 (77,7%)

Legenda: Nº = Número de; LN = Linfonodo confirmado histologicamente; % = porcentagem; DP+/- = Desvio padrão; An = Animal; RM = Radiomarcador.

Entretanto, caso desconsiderado os dois animais que ocorreram óbitos e o coelho em que ocorreu contaminação grosseira da cavidade com RM, ter-se-ia a identificação, por métodos combinados, de SL em 100% dos casos e linfonodos em 96,55% dos casos. Nestes, a média de linfonodos identificados por animal foi igual a 2,31 (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da detecção de linfonodos gástricos (confirmados histologicamente) de acordo com o método usado em 29 animais, não considerando os 3 animais com intercorrências que impossibilitaram completa PLN.

Variáveis	Método de detecção do linfonodo		
	Corante	RM	Combinados
Nº animais em que o LN foi identificado (%)	28 (96,55%)	25 (86,21%)	28 (96,55%)
Média do Nº de LN identificados por An (DP+/-)	2,17 (1,39)	1,69 (1,31)	2,31 (1,34)
Sensibilidade (%)	63/67 (94,0%)	50/66 (75,7%)	67/67 (100%)
Valor preditivo positivo (%)	63/81 (77,8%)	50/63 (79,4%)	67/85 (78,8%)
Acurácia (%)	63/85 (74,1%)	56/85 (65,88%)	67/85 (78,8%)

Legenda: PLN = Pesquisa de linfonodos; Nº = Número de; LN = Linfonodo confirmado histologicamente; % = porcentagem; DP+/- = Desvio padrão; An = Animal; RM = Radiomarcador.

Os métodos de PLN apresentaram grau variado de concordância em relação à confirmação histológica, segundo tempo da avaliação (Tabela 3).

Tabela 3. Concordância entre os métodos de PLN gástricos em cada avaliação por tempo, dada pelo coeficiente de correlação intraclasses.

Métodos	CCI (IC95%)
Suspeita LN só Azul em 5 min x LN com confirmação histológica	0.402 (0.058;0.660)
Suspeita LN só Azul em 10 min x LN com confirmação histológica	0.094 (-0,130;0,359)
Suspeita LN só Azul até 10 min x LN com confirmação histológica	0.388 (0.016;0.659)
Suspeita LN só Azul em 20 min x LN com confirmação histológica	0.524 (0.147;0.772)
Suspeita LN só Rad. em 5 min x LN com confirmação histológica	0.178 (-0.202;0.506)
Suspeita LN só Rad. em 10 min x LN com confirmação histológica	0.281 (-0.103;0.610)
Suspeita LN só Rad. até 10 min x LN com confirmação histológica	0.552 (0.188;0.770)
Suspeita LN só Rad. em 20 min x LN com confirmação histológica	0.082 (-0.462;0.632)
Suspeita LN Met. combinados em 5 min x LN com confirmação histológica	0.354 (0.003;0.625)
Suspeita LN Met. combinados em 10 min x LN com confirmação histológica	0.187 (0.008;0.466)
Suspeita LN Met. combinados até 10 min x LN com confirmação histológica	0.459 (0.073;0.712)
Suspeita LN Met. combinados 20 min x LN com confirmação histológica	0.524 (0.147;0.772)

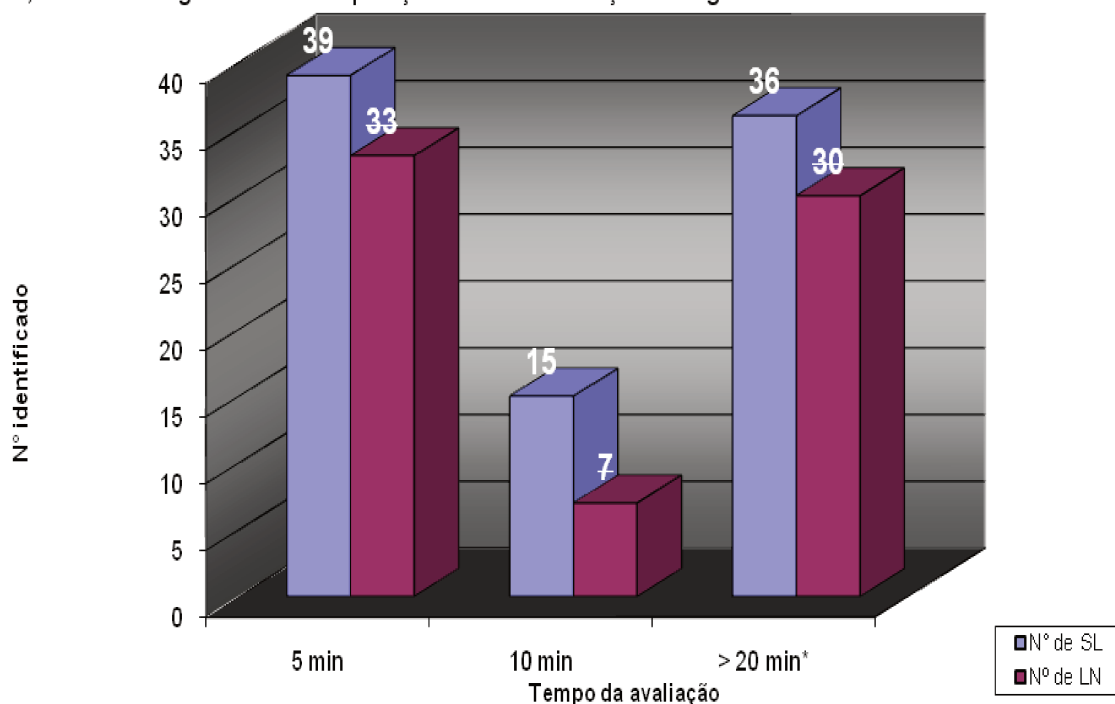
Legenda: LN = linfonodo; min = minutos; Rad. = radioativo; até 10 = Somatória das avaliações aos 5 e 10 minutos; Met. = métodos; IC95% = Intervalo de confiança de 95%; CCI = Coeficiente de correlação interclasses, calculado segundo LANDIS e KOCH (1977). Obs.: Em negrito, destacam-se as situações as quais ocorreram grau de correlação moderada (CCI entre 0,40 e 0,60, segundo Mitra e Lankford 1999).

Ocorreram 20 casos (22,22%) de resultados falso-positivos, ou seja, as estruturas identificadas pelos métodos de pesquisa de linfonodos foram consideradas como tecido linfóide, mas as confirmações histológicas apresentaram-se como tecido gorduroso.

Em relação aos dois coelhos sem identificação de linfonodos, um ocorreu no animal a qual apresentou acidente por perda e grande respingamento do RM, com contaminação grosseira da cavidade abdominal e o outro, ocorreu no coelho a qual agitou (chiou) e apresentou lesão da serosa da parede gástrica. Obs.: Apesar disso, ambos os animais apresentaram identificação de suspeitas de linfonodos pelos métodos combinados.

A maioria das SL (43,3%) e linfonodos (47,2%) foram identificados durante avaliação com o *gamma probe* “*in vivo*” aos 5 min (Gráfico 1) e não foi verificada presença macroscópica de SL localizadas na grande curvatura gástrica (Tabela 4).

Gráfico 1. Distribuição da identificação das SL durante avaliação com o *gamma probe* aos 5, 10 e >20 min, durante PLN gástrico em comparação com a confirmação hitológica.



Legenda: SL = suspeita de linfonodos; LN = Linfonodos confirmados histologicamente.

* = Linfadenectomia realizada durante a gastrectomia.

Tabela 4. Distribuição topográfica dos linfonodos identificados por PLN por meio de métodos combinados com confirmação histológica.

LOCALIZAÇÃO DOS LINFONODOS	Só Azul	Só Radioativo	Azul-Radioativo	Total (%)
Grupo de linfonodos perigástricos:				
Entre o esôfago e o fundo gástrico	1	1	21	23 (32,86%)
Ao longo da pequena curvatura	6	0	7	13 (18,57%)
Periesofágica próximo a pequena curvatura gástrica	4	1	7	12 (17,14%)
Anterior ao fundo gástrico	1	2	2	5 (7,14%)
Posterior ao fundo gástrico	2	0	3	5 (7,14%)
Grupo de linfonodos distantes do estômago:				
Próximo à veia cava	3	0	3	6 (8,57%)
Próximo ao pâncreas	0	0	4	4 (5,72%)
Retroesofágica	0	0	2	2 (2,86%)
Total	17	4	49	70 (100%)

Quanto à identificação das primeiras SL e/ou linfonodos sentinelas, foram identificadas conforme apresentado na tabela 5.

Assim, conforme demonstrado (Tabela 5), caso não considerado os 2 casos de óbito (coelhos 14 e 31) e o animal em que ocorreu grande contaminação da cavidade abdominal após injeção do RM (coelho 32), ter-se-ia ocorrência média por animal de SL sentinela = 1,21 (valores mínimo e máximo = 1 e 2) e de LN sentinela = 1,27 (valores mínimo e máximo = 0 e 4).

A taxa de detecção em avaliações até 10 min de suspeitas de linfonodos sentinelas foi de 100% e de linfonodos sentinelas foi de 81,25% dos casos (Tabela 5).

Das 90 SL, 10 casos apresentaram confirmação histológica para mais de um linfonodo, ou seja, em 7 casos para mesma SL ocorreu identificação histológica de dois linfonodos associados e em 3 casos ocorreram três associados (Anexo 7 – Figura 24).

OBS.: Em dois coelhos, durante dissecação das SL, foi possível identificar macroscopicamente em cada animal, respectivamente um linfonodo esofagofúndico (entre esôfago e fundo gástrico) e um linfonodo retroesofágico não azuis e não radioativos.

Tabela 5. Identificação das primeiras suspeitas de linfonodos e linfonodos sentinelas, segundo tempo da avaliação.

Coelho	Tempo	5 min	10 min	20 min	> 20 min*	Total SL por animal	Total LN por animal
1			1		1 (3)	2	3
2		1				1	1
3		1				1	0
4		1				1	1
5		1				1	1
6		1				1	1
7		2**				2	1
8		2				2	2
9		2			1	2	1
10		1				1	1
11		1				1	1
12		1				1	1
13		1				1	1
14		1				1	1
15		1				1	1
16		1				1	1
17		1				1	1
18		1				1	1
19		1				1	1
20		1(3)/1(1)				2	4
21		1(2)				1	2
22		1	1			1	1
23		1				1	1
24		1(2)				1	2
25		1				1	1
26		1				1	1
27		1				1	1
28		2				2	2
29		1			1	1	1
30		1				1	1
31		2(1)				2	1
32			1			1	0
SL		36	2	0	1	39	
LN		33	1	0	5		39

Legenda: SL = suspeita(s) de linfonodo(s); LN = linfonodo(s) (tecido linfóide); > = após; * = após 20 min, ou seja, linfadenectomia realizada durante a gastrectomia; ** = presença de 2 SL, mas apenas uma foi confirmada como LN.

CORES	CORRESPONDÊNCIA
azul clara =	SL e LN ocorreram simultâneas
verde clara	ocorrência apenas de LN
amarela =	ocorrência apenas de SL

Os 70 linfonodos identificados apresentaram média de tamanho de 2,05 mm (DP +/- 1,30), com dimensão mínima de 0,3 mm (milímetro) e máxima de 6 mm, sendo que 55,7% da amostra possuiu tamanho igual ou superior a 2 mm (Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 23 e Anexo 7 – Figura 24).

4.3 – Avaliação da radioatividade

A radioatividade média aferida dos linfonodos radioativos “*in vivo*” nos tempos 5, 10 e 20 minutos, foram respectivamente 170,7 cps (DP+/- 181,7), 174,6 cps (DP+/-204,5) e 254,7 (DP+/-384,7).

Já na avaliação “*ex vivo*” apresentaram radioatividade média de 221,5 cps (DP+/- 241,2). OBS.: Não foi considerado o animal no qual ocorreu perda e respingamento de RM com contaminação grosseira do interior da cavidade abdominal.

Quanto à avaliação da radioatividade apresentada pelo primeiro linfonodo identificado (sentinela), ocorreu aumento estatisticamente significativo da mesma com o passar do tempo, durante avaliação “*in vivo*” aos 5 ($p = 0,0004$) e 10 minutos ($p = 0,0023$) quando comparadas à avaliação aos 20 minutos (Tabela 6).

A radioatividade média apresentada pelo conteúdo gástrico dos animais nos quais não ocorreu perfuração da parede gástrica foi de 2,15 cps (DP +/- 2,45).

O valor médio apresentado pelo BG foi igual a 6,87 cps (SD+/-15,01), variando entre 0 a 79,5. OBS.: Nesta análise, foi desconsiderado o coelho no qual ocorreu perda e respingamento de RM com contaminação grosseira do interior da cavidade abdominal.

Tabela 6. Análise descritiva e comparativa da quantidade de radioatividade em cps, apresentada pelo primeiro linfonodo radioativo identificado, segundo tempo da avaliação.

Variável	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Identificação					
" <i>in vivo</i> " aos 5 min	151,4	193,6	0,0	82,0	905,0
" <i>in vivo</i> " aos 10 min	170,3	219,2	0,0	110,0	1070,0
" <i>in vivo</i> " aos 20 min	261,0	412,6	0,0	145,0	1900,0
" <i>ex vivo</i> "	225,4	273,5	0,0	140,0	1090,0
Background	6,9	15,1	0,0	2,5	79,5
N = 31* e p < 0,0001**					
Localização das diferenças (teste de perfil por contrastes):					
Identificação					
" <i>in vivo</i> " aos 5 min	x "	" <i>in vivo</i> " aos 10 min,	p=0,3527		
" <i>in vivo</i> " aos 5 min	x "	" <i>in vivo</i> " aos 20 min,	p=0,0004		
" <i>in vivo</i> " aos 5 min	x "	" <i>ex vivo</i> ",	p=0,0772		
" <i>in vivo</i> " aos 10 min	x "	" <i>in vivo</i> " aos 20 min,	p=0,0023		
" <i>in vivo</i> " aos 10 min	x "	" <i>ex vivo</i> ",	p=0,1440		
" <i>in vivo</i> " aos 20 min	x "	" <i>ex vivo</i> ",	p=0,1223		

Legenda: DP = Desvio padrão; N = Número de animais considerado (amostra); min = minutos. * = Não foi considerado o animal a qual ocorreu perda e respingamento de RM com contaminação do interior da cavidade abdominal. ** = A ferramenta ANOVA foi usada para as medidas repetidas com transformação por postos.

A média de radioatividade máxima encontrada "*in vivo*" (segundo tempo do experimento) nas SL, no PX, 1/3 superior de parede gástrica anterior, 1/3 inferior de parede gástrica anterior, região oposta ao PX em parede gástrica posterior e 1/3 inferior de parede gástrica posterior, foram respectivamente, 1900 cps (aos 20 min), 5000 cps (aos 20 min), 98 cps (aos 10 min), 105 cps (aos 20 min), 2650 cps (aos 20 min) e 61,5 cps (aos 20 min). Já "*ex vivo*" (pós-morte no animal em bancada), essas mesmas estruturas apresentaram, respectivamente, valor máximo de 1090 cps, 4350 cps, 15,5 cps, 1/3 inferior da parede anterior gástrica não avaliada, 104 cps e 16,5 cps.

5 – DISCUSSÃO

5.1 – Pesquisa de linfonodo sentinela em câncer gástrico precoce

Atualmente, existem iniciativas que recomendam a realização de PLN sentinela em câncer gástrico precoce, objetivando, principalmente, a indicação de ressecções gástricas e linfadenectomias mais econômicas (KITAGAWA et al., 2006; ONDAIRA et al., 2007; CHENG et al., 2008; ICHIKURA et al., 2009; KITAGAWA et al., 2009; BRAVO NETO et al., 2012).

Com a divulgação do primeiro estudo multicêntrico japonês (KITAGAWA et al., 2009), a PLN sentinela em câncer gástrico precoce se aproxima de uma realidade, porém, porventura seja prudente aguardar os resultados de outros estudos, como por exemplo, o estudo multicêntrico organizado pela *Japan Clinical Oncology Group* (KITAGAWA e KITAJIMA, 2004).

Após, talvez se perca o ceticismo relacionado à segurança oncológica da PLN sentinela, quanto ao seu poder de decisão para a conduta cirúrgica menos invasiva e mais adequada.

Entretanto, apesar do crescente espírito mundial para aprovação da PLN sentinela em câncer gástrico precoce, na prática clínica, permanecem questionamentos relacionados à anatomo-fisiologia gástrica, padronização do método, comprovação histológica quanto à presença das variadas formas de metástases linfonodais e *vies* relacionados à curva de aprendizagem, sendo assim, é exigido, ainda, parcimônia para tomada de decisões (MIYASHIRO, 2012).

5.2 – Padronização de um modelo animal experimental

Com isso, urge a necessidade da padronização de um modelo animal experimental factível para o treinamento e desenvolvimento da PLN sentinela em estômago, antes de alterar o tratamento cirúrgico do câncer gástrico, de forma segura, sem quebra dos princípios éticos, como os apresentados pelo Estudo de Claude Bernard (1895), Código de Nuremberg

(1947) e Declaração de Helsinque (1975) (FAGUNDES e TAHA, 2004; SCHANAIDER e SILVA, 2004; CALASANS-MAIA et al, 2009).

As tentativas existentes para normatização de modelos experimentais animais para PLN em estômago (MÉNDEZ et al., 2003; KIM et al., 2008; RIBEIRO FILHO et al., 2008; TORRES de MELO, 2010), esbarram em obstáculos financeiros, complexidade técnica, apelo sentimental humanístico (modelo canino), deficiências metodológicas, dificuldades com o manejo e aquisição de grande número de animais (Anexo 8 – Quadro 5).

Destacam-se algumas críticas relacionadas aos modelos experimentais animais existentes (Anexo 8 – Quadro 5):

1) Escolha do animal: no Brasil, muitas instituições de ensino e pesquisa, inclusive a Unicamp-SP, devido ao alto apelo sentimental relacionado a utilização de cães em experimentação, proibiram a utilização desses. Ademais, caso considerado o custo para aquisição dos animais, os suínos possuiriam o maior. Quanto ao coelho, apesar de desqualificado como adequado, segundo Torres de Melo (2010), nota-se, conforme demonstrado no modelo desta tese, que foi um animal que possibilitou adequada identificação do estômago, outros órgãos abdominais e linfonodos, por meio de inspeção (visão macroscópica) desarmada da cavidade abdominal.

2) Amostra insuficiente: apresenta-se que para a realização da PLN sentinela de forma adequada é necessário a realização mínima de 26 casos (COX et al., 1998; COCHRAN et al., 2003; TANGOKU et al., 2007; LEE et al., 2009), porém os modelos de Méndez et al. (2003) e Kim et al. (2008) utilizaram tamanho de amostra inferior a 8 animais, dificultando a fundamentação de inferências.

3) Ausência de descrição de intercorrências durante a PLN: como demonstrado neste modelo, em coelho, a presença de intercorrências durante a PLN gástrico, porém em nenhuma das publicações relacionadas aos outros modelos animais, ocorreu descrição. Acredita-se que elas façam parte das dificuldades

inerentes à curva de aprendizagem e, portanto, é necessário conhecê-las para procurar evitá-las.

4) Falta de divulgação de detalhes metodológicos: a falta destes, dificulta e prejudica a adequada reprodução do modelo animal semelhante por outros pesquisadores. Nota-se, no estudo de Méndez et al. (2003), a não divulgação da topografia específica da punção submucosa na parede gástrica e a não apresentação do número médio de linfonodos identificados por animal. Assim como Kim et al. (2008) que também não apresentou o número médio e total de linfonodos identificados por coelho.

5) Ausência de confirmação histológica da presença de tecido linfóide: apesar de macroscopicamente ser nítido a contrastação e identificação por pesquisa radioguiada de suspeitas de linfonodos, conforme demonstrado por meio deste modelo em coelhos, apresentou-se a existência da possibilidade de não confirmação histológica do tecido linfóide. Evidenciou-se a não realização de estudo histológico nos modelos animais apresentados por Méndez et al (2003) e Torres de Melo (2010). Isto impossibilita a realização de cálculos e inferências estatísticas, como por exemplo, a identificação do número de casos falso-positivos e acurácia dos métodos.

6) Ausência da determinação e identificação conceitual da presença dos linfonodos “SENTINELAS”: como demonstrado, a identificação de linfonodos gástricos nos animais é importante, entretanto, o foco aparente de todos os estudos, foi a realização de um modelo para PLN “sentinela”. Sabendo que o linfonodo sentinela conceitualmente é o primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática da lesão tumoral (MORTON et al., 1992; CHEN et al., 2006; KITAGAWA et al., 2007; TANGOKU et al., 2007), não foi apresentado pelos outros modelos animais (MÉNDEZ et. al, 2003; KIM et al., 2008; TORRES DE MELO, 2010) o número e o tempo de identificação exato das primeiras suspeitas de linfonodos identificadas, ou seja, sentinelas, e

sim o número total de linfonodos gástricos identificados no final dos experimentos.

7) Alto custo e complexidade técnica: o modelo de Méndez et al. (2003) utilizou suínos assim como a realização de punções de RM e corante por meio de endoscopia digestiva alta. O estudo de Kim et al. (2008) utilizou a injeção de nanopartículas magnéticas fluorescentes na parede gástrica e por meio de sistema computadorizada de microscopia ótica realizou a identificação dos linfonodos gástricos. Nota-se o alto custo dos modelos e particularmente a complexidade técnica relacionada ao estudo de Kim et al. (2008).

8) Não padronização do momento ideal para realização da PLN sentinelas: os modelos animais de Kim et al. (2008) e Torres de Melo (2010), não divulgaram a padronização do momento mais adequado para a realização da PLN sentinela, visto que não estabeleceram o tempo ideal para identificação das suspeitas de linfonodos sentinelas. Esta definição torna-se importante para que não se superestime a identificação de linfonodos sentinelas, pois com o passar do tempo, o corante percorrerá por rotas linfáticas e linfonodos além dos sentinelas.

9) Difícil manejo dos animais: é fato que quanto maiores as dimensões dos animais, mas difícil será a manipulação desses, em ambiente laboratorial, assim animais de menor porte, como o coelho, apresentam vantagens. Ademais, alguns modelos (TORRES DE MELO, 2010), inclusive o relacionado a esta tese, apresentam a possibilidade de anestesia exclusivamente intramuscular.

10) Dificuldades para adquirir os animais para o experimento: esquecendo obstáculos relacionados a custo, tem-se que o coelho possui o ciclo reprodutivo mais curto (LAPCHIK et al., 2009; ALVES et al., 2011), portanto apresenta maior disponibilidade e número de exemplares para sua aquisição.

Assim, o modelo experimental em coelhos apresentou como principais características: baixo custo (devido principalmente ao uso de instrumentais simples e custo do animal igual a 12,00 reais por quilograma de peso corpóreo) (Anexo 6 - 8.6.2. Figura 14), fácil manejo, ausência de necessidade de jejum pré-operatório, alta disponibilidade de reposição dos animais, boa adaptação ao ambiente laboratorial e pouco apelo sentimental humanístico, como apresentado por outros autores (SCHANAIDER e SILVA, 2004; HRISTOV et al., 2006; CALASANS-MAIA et al., 2009; LAPCHIK et al., 2009; ALVES et al., 2011).

Além disso, apresentou taxa de mortalidade aceitável (6,25% dos casos) e praticidade na execução de anestesia exclusivamente intramuscular, sem a necessidade de estabelecer via aérea definitiva.

Apesar de o coelho possuir menores dimensões em comparação aos outros modelos, caninos e suínos (MÉNDEZ et al., 2003; RIBEIRO FILHO et al., 2008; TORRES de MELO, 2010), quando apresentou peso corpóreo superior a três quilogramas, foram facilmente identificado nesse animal, após laparotomia, seus linfonodos, ductos linfáticos, vasos sanguíneos, todas as partes do estômago e outros órgãos perigástricos.

Ademais, mesmo com a existência no estudo de 19 coelhos mais jovens (idade igual ou inferior a 138 dias), não existiu prejuízo no tamanho e dificuldades técnicas relacionadas à identificação dessas estruturas anatômicas (ALVES et al., 2011; ALVES et al., 2012).

Dimensionando a principal estrutura alvo desta pesquisa, tem-se que os linfonodos exibiram tamanho entre 0,3 e 6 mm (média 2,05 mm), sendo que 55,7% apresentaram dimensões iguais ou superiores a 2 mm (Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 23).

Apesar de apresentarem dimensões 2 vezes menores às apresentadas por estudos em humanos (MIWA et al., 2003), isto não prejudicou a validação deste modelo, haja visto, que o aspecto macroscópico, não serve como único critério para determinar a presença de invasão metastática linfonodal (TANGOKU et al., 2007; MÄRKEL et al., 2011), conforme

comprovado por pesquisa, demonstrando ocorrência de 69 % das metástases em linfonodos com dimensões inferiores a 5 mm (TANGOKU et al., 2007).

5.3 – Método deste modelo animal

Assim, como descritos por outros estudos em humanos, neste experimento foi utilizado métodos combinados de PLN gástricos (HAYASHI et al., 2003; KARUBE et al., 2004; CHENG et al., 2004; CHENG et al., 2005; ICHIKURA et al., 2006; KITAGAWA et al., 2006; LEE et al., 2006; AIKOU et al., 2006; TANGOKU et al., 2007; OZMEN et al., 2008; ICHIKURA et al., 2009), por meio de injeções na subserosa da parede do estômago, com RM e AzP (CHENG et al., 2005; BOFF et al., 2007; RABIN et al., 2010).

Escolheu-se o ^{99m}Tc como radioisótopo para ser empregado nesta pesquisa devido à sua segurança e características físico-químicas (SILVA, 2007; OZMEN et al., 2008), corroborando com a padronização mundial.

Entretanto, seu carreador, o coloide fitato, foi selecionado por ser o mais utilizado para esse fim no Brasil, possuir rápida e fácil preparação, além de baixo custo, reduzido índice de reações adversas (CAMPBELL et al., 1981; TAVARES et al., 2001; ALVES, 2007; SILVA, 2007) e já ser utilizado de rotina pelo Serviço de Medicina Nuclear da Unicamp-SP para a realização linfocintilografias e PLN sentinela para outras neoplasias (cânceres da cabeça e pescoço, melanoma e câncer de mama).

Quanto ao tamanho estimado da partícula coloidal do fitato, “*in vitro*” apresenta-se aproximadamente entre 10 a 20 nm (BUCHPIGUEL, 2004; SILVA, 2007), contudo, neste estudo é indeterminado, haja visto que o fitato “*in vivo*” sofre reação com o cálcio ionizado sérico e presente nos tecidos no qual esta sendo aplicado, ocorrendo aumento do seu tamanho (SUBRAMANIAN et al., 1973), sendo improvável determinar sua exata dimensão (ALVES, 2007).

Assim, apesar de recomendado idealmente para PLN sentinela em câncer gástrico precoce o uso de colóides com tamanho de partícula igual a 100 nm (UENOSONO et al., 2003; HIGASHI et al., 2004), em relação ao

modelo animal aqui exposto, não se justifica a procura pelo tamanho determinado dessa, já que os objetivos pretendidos são a criação de um modelo animal para o treinamento do método de pesquisa e identificação de linfonodos em estômago sem, necessariamente, preocupar-se em identificar as metástases nos linfonodos sentinelas verdadeiros.

Quanto à opção pela escolha de animais saudáveis, não portadores de neoplasia gástrica, assim como optado pelos outros modelos existentes (MÉNDEZ et al., 2003; KIM et al., 2008; TORRES DE MELO, 2010), fundamentalmente estabeleceu-se em decorrência do princípio de criar-se um modelo de PLN em estômago, simples, de fácil manejo, baixo custo e direcionado à aquisição de habilidades técnicas para o cirurgião executante, sem depender de outros profissionais.

Ademais, apesar da atual existência de modelos animais de carcinogênese em estômago (OLIVEIRA et al., 1998; HOUGHTON et al., 2002; PRITCHARD e PRZEMECK, 2004; BORGES DA COSTA et al., 2011), particularmente desenvolvido em ratos, camundongos transgênicos, esquilos e macacos, com a indução de infecção por bactérias da família do *Helicobacter* (PRITCHARD et al., 2004; HOUGHTON et al., 2002), como também, inoculação de células neoplásicas gástricas humanas ACP03 (BORGES DA COSTA et al., 2011), ou contato com compostos N-nitrosos (PRITCHARD et al., 2004; BORGES DA COSTA et al., 2011), não é suficiente para de forma simples, executar-se algum desses modelos em coelhos.

Isso se justifica visto a existência de particularidades biológicas ainda desconhecidas nos coelhos, complexidade e especificidade dos modelos apresentados para desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico (OLIVEIRA et al., 1998; HOUGHTON et al., 2002; PRITCHARD et al., 2004; BORGES DA COSTA et al., 2011; TARSO et al., 2011), necessidade de parcerias com inúmeros outros profissionais (especialmente relacionados às áreas da genética e imunologia) e exigência de estrutura física adequada (laboratórios, biotérios específicos, etc.). Ainda, soma-se como justificativa, o provável distanciamento do objetivo desta tese.

Quanto à escolha do corante vital, Azul Patente V[®], deu-se por ser amplamente utilizado em todo mundo (OZMEN et al, 2008), apresentar baixo custo, fácil manuseio e pequeno risco para reações de hipersensibilidade, em torno de 0,1 a 2% (SHINZATO et al., 2006), incluindo o choque anafilático (SHINZATO et al., 2006; LOPES et al., 2006; BOFF et al. 2007; ALVES, 2007).

Não obstante, fundamentado em inferências originadas do estudo piloto (Anexo 5), optou-se pela não utilização de carvão ativado nos experimentos relacionados a esta tese.

Outro ponto relacionado ao modelo apresentado é com relação à forma e o sítio das punções e injeções do RM e corante na parede gástrica.

Apesar de a maioria dos autores recomendarem punções realizadas por meio de endoscopia digestiva alta, a injeção de corante e/ou radiomarcador na submucosa da parede gástrica, particularmente devido à dificuldade para localização e palpação no intraoperatório de lesões pequenas e superficiais, características do câncer gástrico precoce (KITAGAWA et al., 2005a; OZMEN et al., 2008), optou-se pela execução de injeções na subserosa da parede gástrica por laparotomia.

Acredita-se que a injeção subserosa apresente mais fácil e rápida execução, menor complexidade técnica, sendo ideal para uso por indivíduos em treinamento (LEE et al., 2005).

Ainda, temos a constatação da viabilidade e credibilidade da injeção subserosa, descrita por Lee et al. (2005), devido a existência de uma comunicação e livre passagem de linfa do sistema de drenagem linfática da parede gástrica, do plexo subseroso para o submucoso em humanos.

Isso é possível também inferir para o coelho, visto sua semelhança quanto às características relacionadas à distribuição linfática da parede gástrica de humanos (ZHONG et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001; LEE et al., 2005).

É oportuno apresentar, neste momento, com relação à utilização de métodos combinados de PLN sentinela, ou seja, por meio da aplicação de radiomarcador associado à corante, quanto à necessidade da realização dessas, em intervalo mais curto possível.

Justifica-se tal recomendação devido à possibilidade da ocorrência de moderada inflamação na mucosa gástrica, após a aplicação do RM, modificando a drenagem linfática originada da lesão neoplásica no estômago, podendo dificultar a dispersão do corante aplicado posteriormente (HIGASHI et al., 2003).

Assim, quanto maior o intervalo entre as punções, maiores serão as alterações no sistema de drenagem linfática. Com isto, padronizamos para este modelo animal, a realização de punções e injeções seqüenciais do RM e corante, para evitar esse possível viés metodológico.

Ademais, a opção por realização da PLN gástricos por laparotomia, ocorreu para manter o objetivo de criar um modelo animal simples, de baixo custo, factível para qualquer cirurgião realizar sem a necessidade de treinamento em endoscopia ou do envolvimento de outro profissional.

Não obstante, reforçando a escolha dessa via de acesso, tem-se no coelho a presença constante de conteúdo gástrico apesar de tempo prolongado de jejum (ALVES et al., 2011), além da existência de dificuldades técnicas relacionadas à realização de endoscopia digestiva alta nesse animal (DAVIES e DAVIES, 2003; JOHNSON-DELANEY, 2006; ALVES et al., 2011).

5.4 – Acurácia dos métodos de pesquisa de linfonodos em estômago

A PLN neste modelo apresentou taxa de detecção de linfonodos gástricos de 93,75% e média de linfonodos encontrados por animal igual a 2,19.

Caso considerado apenas a identificação de linfonodos sentinelas, desconsiderando os coelhos que faleceram e o animal em que ocorreu contaminação grosseira da cavidade com RM, este modelo experimental apresentou taxa de detecção de linfonodos sentinelas de 96,55% e média 1,27 linfonodos por coelho (variando entre 0 e 4 linfonodos sentinelas por animal).

Esses resultados foram comparáveis a outros estudos em humanos (HAYASHI et al., 2003; MIWA et al., 2003; KITAGAWA et al., 2005b; LEE, RYU, KIM et al., 2006; TANGOKU et al., 2007).

Em relação à acurácia dos métodos de PLN, é preciso comentar que foi influenciada pela ocorrência de 11% de suspeitas de linfonodos que apresentaram confirmação histológica para mais de um linfonodo (Anexo 7 – Figura 24).

Contudo, os valores apresentados de sensibilidade relacionados aos métodos empregados neste estudo para PLN, devem ser interpretados com cautela, visto que no presente modelo animal não ocorreu a presença de lesão neoplásica gástrica.

No entanto, estes dados serviram para demonstrar que neste modelo, o método por uso do corante foi mais sensível, assim como complementado pela avaliação radio-guiada (HAYASHI et al. 2003; KITAGAWA et al., 2006; LEE et al., 2006).

Como todos os animais possuem teoricamente linfonodos, não se justificou calcular o valor preditivo negativo e especificidade dos métodos de PLN, pois apresentariam resultados nulos.

Neste experimento a identificação e classificação das SL em azuis e/ou radioativas ocorreram também pouco antes e/ou durante a realização da exerece gástrica e esplênica, apesar de ser recomendado em um tempo anterior, variando conforme o tipo de corante utilizado (HIRATSUKA et al., 2001; HAYASHI et al., 2003; MIWA et al., 2003; ISOZAKI et al., 2004; LEE et al., 2005; LEE et al., 2006; OZMEN et al., 2008; ORSENIGO et al., 2008; RABIN et al., 2010).

5.5 – Identificação e confirmação histológica dos linfonodos

A identificação das suspeitas de linfonodos e linfonodos gástricos nos coelhos, por meio de métodos combinados de PLN, ocorreu em sua maioria durante avaliação aos 5 minutos. Isto ocorreu também quando considerado as suspeitas de linfonodos e linfonodos “sentinelas”.

A avaliação aos 5 minutos não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada à confirmação histológica (p suspeita só azul em 5 min = 0,7813; p suspeita só radioativa em 5 minutos = 1,0000; p suspeita por métodos combinados = 1,0000).

Assim, fundamentado:

- 1) No tempo adequado da linfadenectomia para PLN sentinela ser idealmente em tempo anterior a gastrectomia (HIRATSUKA et al., 2001; HAYASHI et al., 2003; MIWA et al., 2003; ISOZAKI et al., 2004; LEE et al., 2005; LEE et al., 2006; OZMEN et al., 2008; ORSENIGO et al., 2008; RABIN et al., 2010);
- 2) Características e tempo de dispersão do Azul Patente (HAYASHI et al., 2003; KIM et al., 2004; KITAGAWA et al., 2005a; TANGOKU et al., 2007 ; ORSENIGO et al., 2008; RABIN et al., 2010);
- 3) Dimensões do sistema de drenagem linfática gástrica do coelho (ZHONG et al., 1998);
- 4) Anatomia do estômago do animal (GHOSHAL e BAL, 1989; HARCOURT-BROWN, 2002; JOHNSON-DELANEY, 2006; HRISTOV et al., 2006; LAPCHIK et al., 2009; RODRÍGUES-ALARCÓN et al., 2010, ALVES et al, 2012); deve-se recomendar a padronização do momento ideal para realização da PLN sentinela em estômago de coelho, por meio de pesquisa radioguiada e método por corante, aos 5 minutos. Esta, em poucos casos, poderá ser realizada em tempo de até 10 minutos, caso não apareça uma primeira suspeita de linfonodo na avaliação anterior.

As vinte intercorrências que ocorreram durante a PLN gástrico, estiveram principalmente relacionadas a problemas ocorridos durante a punção

(60% dos casos). Estas foram conseqüentes à perda ou espalhamento pequeno do RM/AzP injetados, perfuração da parede gástrica, além da presença de grande espalhamento do corante por toda parede gástrica e tecido adiposo próximo.

Todas as intercorrências, com exceção dos dois casos de óbitos e um caso de pneumotórax, foram intercorrências comparáveis a outros estudos realizados em seres humanos (HAYASHI et al., 2003; TANGOKU et al., 2007; LEE et al., 2006).

Apesar dos eventuais acidentes, não existiu interferência do BG nesta amostragem, visto que apresentou valores médios de 4,04 cps (DP +/- 5,9) (TANGOKU et al., 2007). Obs.: Para cálculo deste valor foi desconsiderado o valor (130 cps) apresentado pelo BG do animal a qual ocorreu perda e respingamento do AzP/RM no interior da cavidade abdominal.

Desse modo, dos 32 coelhos estudados foram identificadas 90 suspeitas de linfonodos gástricos por meio do uso de métodos combinados de PLN. Destas 70 (77,77% dos casos) obtiveram confirmação histológica para tecido linfoide.

Ainda, destaca-se a ocorrência na amostra de 38 suspeitas de linfonodos sentinelas, em avaliações realizadas até 10 minutos. Destas 34 (89,47% dos casos) obtiveram confirmação histológica para tecido linfóide.

Os 20 casos falso-positivos apresentaram-se ao estudo histológico como tecido adiposo. Acredita-se que a falha na identificação do tecido linfoide nesses casos foi devido:

- 1) Em um caso (5%), pois ocorreu acidente de punção que ocasionou a contaminação do interior da cavidade abdominal e prejudicou completamente a PLN gástricos;
- 2) Em quatorze casos (70%), ocorreu dificuldade para identificar as SL em locais onde existia maior quantidade de gordura densa (HAYASHI et al., 2003; KITAGAWA e KITAJIMA, 2004), no caso do coelho, nas regiões pericaval e pequena curvatura próximo à cárdia,

tendo como agravante em 4 situações, a presença concomitante de acidentes de punção com grande espalhamento de AzP/RM prejudicando a dissecação das SL (LEE et al., 2006; BOFF et al., 2007);

3) Nos últimos cinco casos (25%), a dissecação excessiva das SL (HAYASHI et al., 2003), na tentativa de sua individualização, provocou provavelmente a perda do tecido linfóide e envio de tecido adiposo para o estudo histológico. Isto pode ser percebido visto à ocorrência de queda expressiva (mais de três vezes) da radioatividade aferida “*in vivo*” em relação à aferida “*ex vivo*” nessas SL.

Acredita-se que para evitar esses casos de falso positivo se deve durante a linfadenectomia das suspeitas de linfonodos, realizar a dissecação e exérese das mesmas juntamente com pequena quantidade de tecido gorduroso, além de executar medidas para evitar acidentes de punção (Anexo 5).

Não obstante, um fato inesperado foi a identificação de três suspeitas desses linfonodos falso-positivas, azul-radioativas, que após a linfadenectomia apresentaram aumento da radioatividade aferida “*ex vivo*”, em relação aos valores apresentados “*in vivo*”.

Talvez, isso possa ser explicado, pois essas SL estavam localizadas em regiões com maior concentração de tecido adiposo e de acesso mais difícil para a sonda do *gamma probe*, não possibilitando apropriada avaliação radio-guiada “*in vivo*” e exata constatação da radioatividade emitida.

Assim, não foi possível constatar se o número de casos positivos encontrados no estudo foi expressivo já que não há fontes para comparações. Entretanto, acredita-se que isto, não prejudicou o escopo desta tese relacionado ao treinamento de cirurgiões perante a execução da PLN gástricos.

Além disso, em relação aos dois linfonodos encontrados no estudo, não azuis e não radioativos, destaca-se que certamente eram linfonodos que não faziam parte da rota linfática relacionada ao ponto de injeção do RM/AzP

(PX), a qual apresenta rede linfática específica para cada coelho. Ainda, não devem caracterizar casos de falso negativos, visto a ausência de células tumorais no modelo animal apresentado.

5.6 – Perspectivas futuras

Apesar da atual divulgação do estudo multicêntrico japonês relacionado à PLN sentinela em câncer gástrico por duplo método (KITAGAWA et al., 2009), é necessário valorizar e combater as deficiências ligadas à curva de aprendizagem com treinamento prático adequado (KURAHASHI et al., 2011), preferencialmente, em decorrência da experimentação primordialmente realizada em animais (FAGUNDES e TAHA, 2004; SCHANAIDER e SILVA, 2004; CALASANS-MAIA et al, 2009).

Parece, baseado nas melhores evidências, que a utilização de métodos combinados com corantes variados e radiomarcador com partícula coloidal idealmente de 100 nm (UENOSONO et al., 2003; LEE et al., 2006), para PLN sentinela em câncer gástrico em humanos, sob padronizações variadas, seja a melhor opção em busca da melhor acurácia.

Entretanto, a confirmação das variadas formas de metástases (metástases, micrometástases e células isoladas tumorais) carece de métodos intraoperatórios precisos (KITAGAWA et al., 2005a), rápidos e de baixo custo, para gerarem inferências capazes de decidir por condutas cirúrgicas menos agressivas.

Talvez o caminho seja a popularização das técnicas de rápido PCR (reação em cadeia de polimerase) (KITAGAWA e KITAJIMA, 2004; KITAGAWA et al., 2005a; MIYAKE et al., 2006; YANAGITA et al., 2008a; YANAGITA et al., 2008b), ou esteja no desenvolvimento de um novo exame, entretanto até lá, é cedo para se confiar plenamente em estudos histológicos de congelação (KITAGAWA et al., 2005a).

Basta-se usufruir da existência de modelos animais para treinamento prático, possibilitando a automatização e superação dos percalços relacionados

à curva de aprendizagem, assim como possibilitar o desenvolvimento de melhores tecnologias e normatização final, para o mais breve possível, conceber a PLN sentinela em câncer gástrico precoce, com idoneidade equivalente à já apresentada no câncer de mama e melanoma.

6 – CONCLUSÃO

O modelo animal experimental em coelhos para pesquisa de linfonodos gástricos foi factível, com boa taxa de detecção (em avaliações até 10 min) de suspeitas de linfonodos e linfonodos sentinelas. Apresentou baixa mortalidade, capaz de simular intercorrências semelhantes às encontradas em humanos, de fácil execução e manejo, sendo considerado adequado para iniciar o treinamento de profissionais que almejem realizar a pesquisa de linfonodos sentinelas em estômago.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aikou T, Kitagawa Y, Kitajima M, Uenosono Y, Bilchik AJ, Martinez SR, et al. Sentinel lymph node mapping with GI cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:269-277.

Akagi T, Shiraishi N, Kitano S. Lymph node metastasis of gastric cancer. *Cancers* 2011;3:2141-2159.

Alex JC, Krag DN. Gama-probe-guided localization of lymph nodes. *Surg Oncol* 1993;2:137-44.

Alves JCRR. Linfocintigrafia e biópsia de linfonodos-sentinela, com uso isolado de radiofármaco em dose única no melanoma cutâneo [Doutorado]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais 2007; 97 fl:il.

Alves JR, Lopes LR, Sasasaki T. Perioperative care in an animal model for training in abdominal surgery: is it necessary a preoperative fasting? *Acta Cir Bras* 2011; 26:541-48.

Alves JR, Lopes LR, Sasasaki T. Morphometric study in stomach of rabbits. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2012 (*in submission*).

Balbinotto RP, Trindade MRM, Meyer FS, Muller ALL, Rosa Jr A, Nunes AG, et al. Anesthetic protocol for videolaparoscopic surgery in rabbits. *Acta Cir Bras* 2010;25(1):121-125.

Bensley BA, Craigie EH. Practical anatomy of the rabbit. 8.ed. Canada: University of Toronto Press; 1948.

Boff MF, Schirmer CC, Edelweiss MIA, Meurer L. Pesquisa do linfonodo sentinela em câncer gástrico com o corante azul patente. *Rev Col Bras Cir* 2007; 34(6):367-373.

Borges da Costa JdFF, Leal MF, Silva TCR, Andrade Junior EF, Rezende AP, Muniz JAPC, *et al.* Experimental Gastric Carcinogenesis in *Cebus apella* Nonhuman Primates. PLoS ONE 2011; 6(7: e21988): 1-13.

Bravo Neto GP, Santos EG, Loja CAS, Victor FC, Neves MS, Pinto MF, *et al.* Ressecções gástricas Menores com linfadenectomia modificada em câncer gástrico precoce com linfonodo sentinela negativo. Rev Col Bras Cir 2012; 39(3):183-188.

Buchpiguel CA. Controvérsias e avanços técnicos na detecção do linfonodo sentinela. Radiol Bras 2004; 37(4):III-V.

Buscombe JR, Holloway B, Roche N, Bombardieri E. Position of nuclear medicine modalities in the diagnostic work-up of breast cancer. Q J Nucl Med Mol Imaging 2004; 48(2):109-118.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 1977; 39:456–466.

Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Áscoli FO, Granjeiro JM. The rabbit as an animal model for experimental surgery. Acta Cir Bras 2009; 24(4): 325-328.

Campbell J, Bellen JC, Baker RJ, Cook DJ. Technetium-99m calcium phytate – optimization of calcium content for liver and spleen scintigraphy: consise communication. J Nucl Med 1981; 22:157-160.

Catarci M, Guadagni S, Zaraca F, Pistoia MA, Mastracchio A, Trecca A, *et al.* Prospective randomizes evaluation of preoperative endoscopic vital staining using CH-40 for lymph node dissection in gastric cancer. Ann Surg Oncol 1998; 5(7):580-584.

Chen SL, Iddings DM, Scheri RP, Bilchik AJ. Lymphatic mapping and sentinel node analysis: current concepts and applications. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:292-309.

Cheng LX, Xie ZY, Dai GR, Zhao WG. Preliminary experiences of application of sentinel lymph node navigation technique in early gastric cancer. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2008; 46(14):1076-1079.

Cheng LY, Chen XD, Zhang YX, Feng XD. Clinical significance of sentinel lymph node detection by combining the dye-directed and radioguided methods in gastric cancer *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2005; 43 (9):569-572.

Cheng LY, Zhong SZ, Huang ZH. Sentinel lymph node concept in gastric cancer with solitary lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(20):3053-3055.

Choi HJ, Kim YK, Kim YH, Kim SS, Hng SH. Occurrence and prognostic implications of micrometastases in lymph nodes from patients with submucosal gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(1):13-19.

Coburn NG. Lymph node and gastric Cancer. *J Surg Oncol* 2009; 99:199-206.

Cochran AJ, Roberts AA, Saída T. The place of lymphatic mapping and sentinel node biopsy in oncology. *Int J Clin Oncol* 2003; 8:139-150.

Conover, W.J. *Practical Nonparametric Statistics*. Nova York: John Wiley & Sons Inc.; 1971.

Cox CE, Pendas S, Cox JM, Joseph E, Shons AR, Yeatman T, et al. Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer. *Ann Surg* 1998; 227:645-653.

Davies RR, Davies JAER. Rabbit gastrointestinal physiology. *Vet Clin Exot Anim* 2003; 6:139-153.

EURORAD S.A. Strasbourg - France. [Acesso em 05 jun 2011]. Disponível em URL: <http://www.eurorad.com/news.php>

Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras* 2004; 19(1): 59-65.

Freitas AHA, Nunes TA, Wainstein AJA, Barroso AA, Ricardo-Filho OP, Dias MA, et al. Pesquisa de linfonodo sentinela em pacientes com adenocarcinoma de cólon. *Rev Bras Coloproct* 2008; 28(2):170-177.

Fukagawa T, Sasako M, Ito S, Nakanishi H, Iinuma H, Natsugoe S, Katai H, et al. The prognostic significance of isolated tumor cells in the lymph nodes of gastric cancer patients. *Gastric Cancer* 2010; 13:191-196.

Ghoshal NG, Bal HS. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Lab Anim* 1989; 23:21-29.

Gipponi M, Solari N, Di Somma FC, Bertoglio S, Cafiero F. New fields of application of the sentinel lymph node biopsy in pathologic staging of solid neoplasms: review of literature and surgical perspectives. *J Surg Oncol* 2004; 85:171-174.

Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994; 220:391–398

Gotoda T, Yanagisawa A, Sasako M, Ono H, Nakanishi Y, Shimoda T, et al. Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers. *Gastric Cancer* 2000; 3(4):219-225.

Gould EA, Winship T, Philbin Ph, Kerr HH. Observations on “sentinel lymph node” in cancer of the parotid. *Cancer* 1960; 13:77-78.

Haigh PI, Lucci A, Turner RR, Bostick PJ, Krasne DL, Stem SL, et al. Carbon dye histologically confirms the identity of sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma. *Cancer* 2001; 92(3):535-541.

Harcourt-Brown F. *Textbook of Rabbit Medicine*. Oxford, UK: Butterworth Heinemann; 2002.

Hayashi H, Oshiai T, Mori M, Karube T, Suzuki T, Gunji Yet al. Sentinel lymph node mapping for gastric cancer using a dual procedure with dye and gamma probe-guided techniques. *J Am Coll Surg* 2003; 196:68-74.

Higashi G, Natsugoe S, Uenosono Y, Ehi K, Arigami T, Nakabeppu Y, *et al*. Particle size of tin and phytate colloid in sentinel node identification. *J Surg Res* 2004; 121:1-4

Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, Furukawa H, Motomura K, Ohigashi K, et al. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. *Surgery* 2001; 129:335-340.

Houghton J, Fox J G, Wang TC. Gastric cancer: Laboratory bench to clinic. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:495–502.

Hristov H, Kostov D, Vladova D. Topographical anatomy of some abdominal organs in rabbits. *Trakia Journal of Sciences* 2006; 4(3):7-10.

Huang GJ, Chen ZQ, Zhang YL, Zhang QH, Liu Y, Quian LP, et al. Effect of injectiong activated carbon ultramicroparticles around the gastric tumor on staining lymph node. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84(24):2070-2072.

Ichikura T. Progress in sentinel node navigation surgery for gastric cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2009; 110(2):68-72.

Ichikura T, Chochi K, Sugasawa H, Yaguchi Y, Sakamoto N, Takahata R, et al. Individualized surgery for early gastric cancer guided by sentinel node biopsy. *Surgery* 2006; 139:501-507.

Ichikura T, Morita D, Uchida T, Okura E, Majima T, Ogawa T. Sentinel node concept in gastric cancer. *World J Surg* 2002; 26(3):318-22.

Ichikura T, Sugasawa H, Sakamoto N, Yaguchi Y, Tsujimoto H, Ono S. Limited gastrectomy with dissection of sentinel node stations for early gastric cancer with negative sentinel node biopsy. *Ann Surg* 2009; 249:942-947.

Instituto Nacional do Câncer – INCA. Incidência de câncer no Brasil 2010 [Acesso em 02 de maio de 2011]. Disponível em URL:<http://www.inca.gov.br>

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN. Fitato: Informações ao profissional de saúde 2011 [Acesso em 02 de junho de 2011]. Disponível em URL: <https://www.ipen.br/conteudo/upload/201104250816480.FITATO.pdf>

Isozaki H, Kimura T, Tanaka N, Satoh K, Matsumoto S, Nimomiya M, et al. An assessment of the feasibility of sentinel lymph node-guided surgery for gastric cancer. *Gastric Cancer* 2004; 7:149-153.

Jafelicci Junior M, Varanda LC. O mundo dos colóides. *Química nova na escola* 1999 (9):9-13.

Japanese Gastric Cancer Association (JGCA). Japanese Classification of Gastric Carcinoma, 2nd ed., *Gastric Cancer* 1998; 1:10-24.

Japanese Gastric Cancer Association (JGCA). Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 (ver. 3) [Acesso em 05 de junho de 2011]. *Gastric Cancer* 2011; May 14. Disponível em URL: <http://www.springerlink.com/content/12838416614jqgh1/fulltext.pdf>

Johnson-Delaney CA. Anatomy and physiology of the rabbit and rodent gastrointestinal system. Proceedings [on line] 2006 [Acesso em 06 mai 2011]. Disponível em URL: <http://www.chincare.com/HealthLifestyle/HLdocs2/gastrointestinal.pdf>.

Karube T, Ochiaia T, Shimada H, Nikaidou T, Hayashi H. Detection of sentinel lymph nodes in gastric cancers based on immunohistochemical analysis of micrometastases. J Surg Oncol 2004; 87:32-38.

Kim M, Kim H, Jung G, Lee J, Choi S, Kang D, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy using 99mTC tin colloid in gastric cancer. Ann Surg 2004; 239(3): 383-7.

Kim JS, Yoon TJ, Kim HK, Kim SS, Chae HS, Choi MG, et al. Sentinel lymph node mapping of the stomach using fluorescent magnetic nanoparticles in rabbits. Korean J Gastroenterol 2008; 51:19-24.

Kitagawa Y, Fujii H, Kumai K, Kubota T, Saikawa Y, Yoshida M, et al. Recent advances in sentinel node navigation for gastric cancer: a paradigm shift of surgical management. J Surg Oncol 2005a; 90:147-152.

Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Watanabe M, et al. The role of the sentinel lymph node in gastrointestinal cancer. Surg Clin North Am 2000. 80(6):1799-1809.

Kitagawa Y, Kitajima M. Sentinel node mapping for gastric cancer: is the jury still out? Gastric Cancer 2004; 7:135-137.

Kitagawa Y, Kitano S, Kubota T, Koichiro K, Otani Y, Saikawa Y, et al. Minimally invasive surgery for gastric câncer – toward a confluence of two major streams: a review. Gastric Cancer 2005b; 8:103-110.

Kitagawa Y, Saha S, Kubo A, Kitajima M. Sentinel node for gastrointestinal malignancies. Surg Oncol Clin N Am 2007; 16:71-80.

Kitagawa Y, Saikawa Y, Takeuchi H, Mukai M, Nakahara T, Kubo A, et al. Sentinel node navigation in early stage gastric cancer – updated data and current status. *Scand J Surg* 2006; 95:256-259.

Kitagawa Y, Takeuchi H, Takagi Y, Natsugoe S, Terashima M, Murakami N, et al. Prospective multicenter trial of sentinel node mapping for gastric cancer. In: 2009 ASCO Annual Meeting Proceedings – Poster Discussion Session. *J Clin Oncol* 2009; 27(15S): Abstract n° 4518.

Kurahashi AM, Harvey A, MacRae H, Moulton CA, Dubrowski A. Technical skill training improves the ability to learn. *Surgery* 2011; 149:1-6.

Kwee RM, Kwee TC. Imaging in assessing lymph node status in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2009; 12:6-22.

Kwee RM, Kwee TC. Predicting lymph node status in early gastric cancer. *Gastric Cancer* 2008; 11: 134-148.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74.

Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. *Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório*. Ed Atheneu, São Paulo, 2009.

Lee JH, Ryu KW, Kim CG, Kim SK, Choi IJ, Kim YW, et al. Comparative study of the subserosal versus submucosal dye injection method for sentinel node biopsy in gastric cancer. *EJSO* 2005;31:965-8.

Lee JH, Ryu KW, Kim CG, Kim SK, Lee JS, Kook MC, et al. Sentinel node biopsy using dye and isotope double tracers in early gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 2006; 13(9):1168-1174.

Lee JH, Ryu KW, Lee SE, Cho SJ, Lee JY, Kim CG, et al. Learning curve for identification of sentinel lymph node based on a cumulative sum analysis in gastric cancer. *Dig Surg* 2009; 26(6):465-470.

Lira AS, Chaves Neto A. Coeficientes de correlação para variáveis ordinais e dicotômicas derivados do coeficiente linear de Pearson. *RECIE*. 2006; 15(1/2):45-53.

Lopes A, Wainstein AJA, Schirmer CC, Ferreira FO, Belfort FA, Pinheiro LGP, et al. Consensos do XXVI Congresso Brasileiro de Cirurgia – Consenso 4: Linfonodo sentinela em câncer. *Boletim CBC Edição Especial* 2006; 14-21.

Louisiana Veterinary Medical Association – LVMA, 2011 [Acessado em 6 mai 2011]. Disponível em: URL: <http://www.lvma.org/rabbit.html>.

Märkl B, Moldovan AI, Jähnig H, Cacchi C, Spatz H, Anthuber M, et al. Combination of ex vivo sentinel lymph node mapping and methylene blue-assisted lymph node dissection in gastric cancer: a prospective and randomized study. *Ann Surg Oncol* [on-line] 2011 [Acesso em 01 maio 2011]; Disponível em: URL: http://www.annsurgoncol.org/Journals/Online_first.html?p=2&c=

Märkl B, Wunsch K, Hebick KU, Anthuber M, Probst A, Arnholdt HM, et al. Methylene blue-assisted lymph node dissection in combination with ex vivo sentinel lymph node mapping in gastric cancer. *Histopathology* 2009; 54:433-441.

Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, et al. Can sentinel node biopsy indicate rational extend of lymphadenectomy in gastric cancer surgery? *Langenbeck's Arch Surg* 1999; 384:149-157.

McCulloch P, Niita Me, Kazi H, Gama-Rodrigues JJ. Gastrectomy with extended lymphadenectomy for primary treatment of gastric cancer. *Br J Surg* 2005; 92:5-13.

McLoughlin JM. Adenocarcinoma of the stomach: a review. BUMC Proceedings 2004; 17:391-399.

Méndez J, Wallace AM, Hoh CK, Vera DR. Detection of gastric and colonic sentinel nodes through endoscopic administration of ^{99m}Tc-DTPA-Mannosyl-Dextran in pigs. J Nucl Med 2003; 44:1677-1681.

Meredith A, Jepson L. The Rabbit [on line]. Head of Exotic Animal Services Royal (Dick) School of Veterinary Studies University of Edinburgh [Acesso em 06 mai 2011]. Disponível: URL:<http://www.morfz.com/THERABBIT.pdf>

Mitra A, Lanford S. Research methods in park, recreation and leisure services. Champaign: Sagamore Publishing, 1999.

Miwa K, Kinami S, Taniguchi K, Fushida S, Fujimura T, Nonomura A. Mapping sentinel nodes in patients with early-stage gastric carcinoma. Br J Surg 2003; 90: 178–82.

Miyake K, Seshimo A, Kameoka S. Assessment of lymph node micrometastasis in early gastric cancer in relation to sentinel nodes. Gastric Cancer 2006; 9:197-202.

Miyashiro I. What is the problem in clinical application of sentinel node concept to gastric cancer surgery? J Gastric Cancer 2012; 12(1):7-12.

Montgomery, D.C. Design and Analysis of Experiments, 3^a ed. Nova York: John Wiley & Sons.; 1991.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg 1992; 127:392-399.

Moynihan B. The surgical treatment of cancer of the sigmoid flexure and rectum. Surg Gynecol Obstet 1908; 6:463-466.

Noh SH, Hyung WJ, Cheong JH. Minimally Invasive Treatment for Gastric Cancer: Approaches and Selection Process. J. Surg. Oncol. 2005;90:188–194.

Ohdaira H, Nimura H, Mitsumori N, Takahashi N, Kashiwagi H, Yanaga K. Validity of modified gastrectomy combined with sentinel node navigation surgery for early gastric cancer. Gastric Cancer 2007; 10:117-122.

Oliveira LR, Molinari SL, Natali MRM, Michelan AC, Scapinello C. Morphologic considerations about the wall of the glandular stomach of young rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Rev Chil Anat. 2001; 19(3): 253-258.

Oliveira PFM, Henriques LA, Rodrigues Filho F, Almeida PRC, Moraes MO. Estabelecimento de um modelo de tumor experimental pela inoculação do tumor de Walker em estômago de rato. Acta Cir Bras 1998; 13(4):243-248.

Orsenigo E, Tomajer V, Palo SD, Albarello L, Doglioni C, Masci E, et al. Sentinel node mapping during laparoscopic distal gastrectomy for gastric cancer. Surg Endosc 2008; 22:118-121.

Ott K, Herrmann K, Krause BJ, Lordick F. The value of PET imaging in patients with localized gastroesophageal cancer. Gastrointest Cancer Res 2008; 2:287–294

Ozmen MM, Ozmen F, Zulfikaroglu B. Lymph nodes in gastric cancer. J Surg Oncol 2008; 98:476-481.

Pereira RJ, Oliveira Filho RS, Zuliani CR, Videira RVS, Simões MM, Enokihara S, et al. Solução de carvão ativado e corante vital para a biópsia de linfonodo sentinela em ratos. Einstein 2008; 6(4):463-466.

Piasecki C, Wyatt C. Patterns of blood supply to the gastric mucosa. A comparative study realing an end-artery-model. J Anat 1986; 149:21-39.

Pritchard DM, Przemeck SMC. Review article: how useful are the rodent animal models of gastric adenocarcinoma? *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19:841-859.

Rabin I, Chikman B, Lavy R, Poluksht N, Halpern Zvi, Wassermann I, et al. The accuracy of sentinel node mapping according to T stage in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2010; 13:30-35.

Reilly J. Variables in animal based research: Part 2. Variability associated with experimental conditions and techniques. *AANZCCART News* 1998; 11(1):1-12.

Ribeiro Filho HH, Aragão DHP, Pinheiro LGP. Modelo experimental para pesquisa de linfonodo sentinela no antro gástrico da cadela. In: XXVII Encontro de Iniciação Científica, Pernambuco – Ceará: Universidade Federal do Ceará 2008; Pôster 1.1.25.31.

Rodríguez-Alarcón C, Pérez E, Martín U, Rivera R, Hernández A, Vivo J, Beristain M, Usón J. Morfometría del esófago abdominal y del estómago del conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Aplicaciones a la cirugía laparoscópica. *Int J Morphol*. 2010; 28(1):27-31.

Ryu KW, Lee JH, Kim HS, Kim YW, Choi IJ, Bae JM. Prediction of lymph nodes metastasis by sentinel node biopsy in gastric cancer. *EJSO* 2003; 29: 895–9.

Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M. Clinical significance of skip metastasis in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer* 2007; 10:87-91.

Saka M, Morita S, Fukagawa T, Katai H. Present and Future Status of Gastric Cancer Surgery. *Jpn J Clin Oncol* 2011; 41(3):307-313.

Sapienza MT, Campos Neto GC, Belfort FA, Marone MMS, Tavares MGM, Lopes MMMF, et al. Pesquisa do linfonodo sentinela em pacientes com melanoma: experiência com fitato marcado com Tecnécio-^{99m} e revisão da literatura. *An Bras Dermatol* 2004; 79(2):181-191.

Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cir Bras 2004; 19(4): 441-447.

Shi Y, Zhou Y. The role of surgery in the treatment of gastric cancer. J Surg Oncol 2010; 101: 687-692.

Shinzato JY, Marcaccini ACP, Braga AFA, Ribeiro AR, Rubio JEM, Souza JPD. Reação anafilática ao corante azul patente durante a biópsia do linfonodo sentinela em câncer de mama inicial – relato de caso. Rev Bras Ginecol Obstet 2006; 28(12):728-732

Silva CMDR. Pesquisa radio-guiada do linfonodo sentinela no câncer gástrico. [Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2007; 72 fl:il.

Subramanian G, McAfee JG, Mehter A, Blair RJ, Thomas ED. Tc-99m stannous phytate: a new in vivo colloid for imaging the reticuloendothelial system. J Nucl Med 1973; 14:459

Tangoku A, Seike J, Nakano K, Nagao T, Honda J, Yoshida T, et al. Current status of sentinel lymph node navigation surgery in breast and gastrointestinal tract. J Med Invest 2007; 54:1-18

Tanis PJ, Nieweg OE, Olmos RAV, Rutgers EJT, Kroon BBR. History of sentinel node and validation of the technique – Review. Breast Cancer Res 2001; 3:109–112.

Tarso L, Meyer FS, Cioato MG, Meurer L, Schirmer CC. O modelo experimental de carcinogênese gástrica induzido por N-Methyl-N-Nitrosourea em ratos F344 e camundongos C3H é válido para os ratos Wistar? ABCD Arq Bras Cir Dig 2011; 24(1):55-58.

Tavares MGM, Sapienza MT, Galeb Jr NA, Belfort FA, Costa RR, Osório CABT, et al. The use of ^{99m}Tc-pytate for sentinel node mapping in melanoma, breast

cancer and vulvar cancer: a study of 100 cases. Eur J Nucl Med 2001; 28:1597-1604.

Torres de Melo JRM. Modelo experimental em caninos para pesquisa de linfonodo sentinela no estômago [Mestrado]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará 2010; 85 fl:il.

Tisioulis GJ, Wood TF, Morton DL, Bilchik AJ. Lymphatic mapping and focused analysis of sentinel lymph nodes upstage gastrointestinal neoplasms. Arch Surg 2000; 135(8):926-932.

Uenosono Y, Natsugoe S, Ehi K, Arigami T, Hokita S, Aikou T. Detection of sentinel nodes and micrometastases using radiotracer navigation and immunohistochemistry in patients with gastric cancer. Br J Surg 2005; 92:886-889.

Uenosono Y, Natsugoe S, Natsugoe S, Higashi H, Ehi K, Miyazono F, *et al.* Evaluation of colloid size for sentinel nodes detection using radioisotope in early gastric cancer. Cancer Lett 2003; 200:19-24.

Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrida S, Bedoni M, *et al.* Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. Lancet 1997; 349:1864-1867.

Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrida S, Luini A, Galimberti V, *et al.* Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. Ann Surg 2010; 251(4):595-600.

World Health Organization (WHO). Cancer. Fact sheet N°297 [on-line] February 2011 [Acesso em 02 de maio de 2011]. Disponível em: URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>

Yamaguchi T, Sano T, Katai H, Sasako M, Maruyama K. Node-positive mucosal gastric cancer: a follow-up study. Jpn J Clin Oncol 2001; 31(4): 153-156.

Yanagita S, Natsugoe S, Uenoson Y, Arigami T, Arima H, Kozono T, et al. Detection of micrometastases in sentinel node navigation surgery for gastric cancer. *Surg Oncol* 2008a; 17:203-210.

Yanagita S, Natsugoe S, Uenoson Y, Kozono T, Ehi K, Arigami T, et al. Sentinel node micrometastases have high proliferative potencial in gastric cancer. *J Surg Res* 2008b; 145:238-243.

Zhong SQ, Xu YD, Zhang YF, Zhang YF, Zhang YF, Hai LS, et al. Three-dimensional structure of lymphatics in rabbit stomach. *WJG* 1998; 4(6):550-552.

Zulfikaroglu B, Koc M, Ozmen M, Kucuk NO, Ozalp N, Aras G. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy using radioactive tracer in gastric cancer. *Surgery* 2005; 138:899-904.

8.1 - ANEXO 1. AUTORIZAÇÃO LTCCE

Campinas, 09 de novembro de 2009.

AUTORIZAÇÃO (ANEXO 1)

Autorizo o médico **JOSÉ ROBERTO ALVES** (CRM/SP 116837 / CPF nº 006437989-27) a ter livre acesso ao Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental / NMCE da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, para poder desenvolver seu projeto de pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL PARA PESQUISA DE LINFONODOS SENTINELAS EM ESTÔMAGO ATRAVÉS DE MÉTODOS COMBINADOS: CORANTE E RADIOFÁRMACO, sob a orientação do Profº. Dr. LUIZ ROBERTO LOPES, docente da FCM – Unicamp, a iniciar vinculado ao programa de pós-graduação em cirurgia (Mestrado) a partir de 01 de março de 2010 até término de sua pesquisa.



Dr. Reinaldo Wilson Vieira

Coordenador do Lab. de Técnica Cirúrgica e

Cirurgia Experimental

***8.2 - ANEXO 2. TERMO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO
DE ANIMAIS CEUA/UNICAMP***



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2033-1**, sobre "**Desenvolvimento de um modelo experimental animal para pesquisa de linfonodos sentinelas em estômago através de modelos combinados: corante e radiofármaco**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Luiz Roberto Lopes / José Roberto Alves**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **18 de novembro de 2009**.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **2033-1**, entitled "**Development of experimental animal model for sentinel lymph node in stomach by combined methods: dye and radiopharmaceutical**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 18, 2009**.

Campinas, 18 de novembro de 2009.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

8.3 - ANEXO 3. FICHA DE CADASTRO DO ANIMAL

ANEXO 3. FICHA DE CADASTRO DO ANIMAL – N°

DATA: ____/____/2010

1) IDENTIFICAÇÃO:

1.1. Sexo: Masculino **1.2. Idade:** meses (DN / /2010) - dias

1.3. Peso: _____ gramas **1.4. Jejum:** horas (_____).

2) GLICEMIA:

Inicial =

Durante =

Final =

3) LINFONODOS PERI-GÁSTRICO:

3.1. Ponto de Injeção previsto: (X) B (3,5 cm da peq curv em direção a grande curv)

Se outro, especificar e justificar: _____

3.2. Tipo de substância e volume injetados (Ordem da injeção: 1° RM depois AzP):

RM = 0,1 ml (0,2 mCi) AzP (sem carvão) = 0,2 ml (após tirar ar da agulha).

3.3. AFERIÇÕES (Radioatividade aferida *in vivo*):

3.3.1. CAVIDADE PRÉ-PROCEDIMENTO: _____ cps

3.3.2. TEMPO 5 min:

- SI =

- EA 1/3 S =

- EA 1/3 I =

- SL (suspeitas de linfonodos) =

3.3.3. TEMPO 10 min:

- SI =

- EA 1/3 S =

- EA 1/3 I =

- SL =

Legenda: E = estômago; A = parede gástrica anterior; SI = sítio das injeções; S = superior; I = inferior.

3.3.4. TEMPO 20 min:

VARIAÇÃO DE CONTAGENS	EUROPROBE (E)	PROBE IPEM (I)
SI (Sítio injeção)		
Parede anterior (1/3 superior)		
Parede anterior (1/3 inferior)		
Parede posterior / SI		
Parede posterior		
Linfonodos		
SL1		
SL2		
SL3		
SL4		
SL5		
Outros órgãos (cav. pós-grastre) - RIV		

- LINFONODOS IDENTIFICADOS APÓS DISSECÇÃO (20 min): RIV/REV:

	I	E
SL 1 – tipo () - Local () -REV =		
SL 2 – tipo () - Local () -REV =		
SL 3 – tipo () - Local () -REV =		
SL 4 – tipo () - Local () -REV =		
SL 5 – tipo () - Local () -REV =		

Legenda: REV = Radioatividade *ex vivo*; RIV = Radioatividade *in vivo*; I = *gamma-probe* do IPEN; E = *Europrobe*.

4) GASTRECTOMIA + AFERIÇÃO DE ESTÔMAGO após 20 min:

4.1. RADIAÇÃO IDENTIFICADA (Radioatividade aferida *ex vivo*):

SI na EA REV = _____
SI na EP REV = _____
EA – REV = _____
EP – REV = _____
CG – SOG – REV = _____
Líquido da SOG – REV = _____

Legenda: P = parede gástrica posterior; CG = conteúdo gástrico; SOG = sonda orogástrica.

5) CONTEÚDO GÁSTRICO:

5.1. SOG: ml.

5.2. Peso CG: gramas.

5.3. Características CG:

- () Cecocotrofos sólidos / () Vestígios de ração / () pelos
() Cecocotrofos diluídos + rações / () Outros _____

6. TEMPOS:

6.1. TEMPO TOTAL PROCEDIMENTO: minutos.

6.2. TEMPO EUTANÁSIA: minutos.

7. OBSERVAÇÕES:

7.1. ACIDENTES: _____

8. ESQUEMA ILUSTRATIVO:

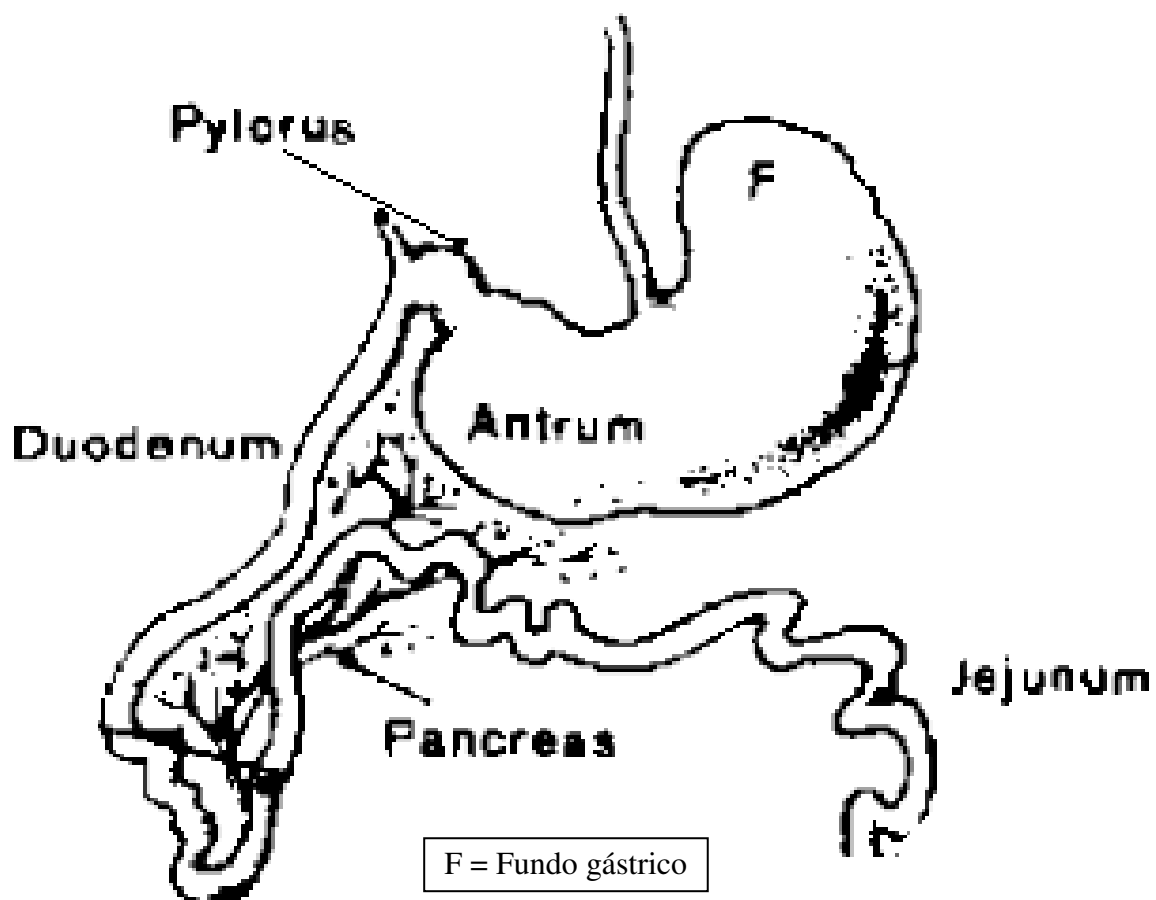


Figura 8. Esquema demonstrando o estômago, para classificação topográfica das SL encontradas

***8.4 - ANEXO 4. CONCEITOS BÁSICOS
RELACIONADOS À PLN RADIO-GUIADA***

Para facilitar o entendimento desta tese, apresenta-se abaixo algumas considerações referentes aos conceitos básicos relacionados a PLN sentinelas radio-guiada.

Neste estudo, realizou-se a PLN através da injeção de corante vital e RM com posterior pesquisa de linfonodos gástricos por inspeção (visualização das suspeitas de linfonodos corados) e pesquisa radio-guiada de suspeitas de linfonodos radioativas com o *gamma probe*. Esta só foi possível graças à presença do radiomarcador circulante presente no sistema linfático e linfonodos dos animais.

O radiomarcador neste estudo foi constituído pelo radioisótopo tecnécio 99-m, e pelo coloide fitato.

Sabendo que nem todos possuem a vivência necessária para o entendimento pleno deste estudo, é indicado conceituarmos o termo coloide. Trata-se de misturas heterogêneas de pelo menos duas fases diferentes, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida (sólido, líquido ou gás), denominada fase dispersa (constituente em menor quantidade), misturada com uma fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão (constituente em maior quantidade) (JAFELICCI JUNIOR e VARANDA, 1999; BUCHPIGUEL, 2004).

Assim, o coloide injetado no interstício, devido ao seu tamanho (UENOSONO et al., 2003), não pode ser absorvido pelos capilares sanguíneos, sendo absorvido apenas pelos capilares linfáticos e quando associado a radioisótopos poderá ser identificado através da captação de radiação captada pela sonda do *gamma probe* ou câmara cintilográfica.

8.5 - ANEXO 5. ESTUDO PILOTO

5. ESTUDO PILOTO

Foi constituído de 8 coelhos, do sexo masculino, escolhidos consecutivamente (ou seja, o coelho 1 foi o primeiro animal do estudo e o coelho 8 o último), com idade e peso, respectivamente, variando entre 3 a 4 meses e 2950 a 3200 gramas, submetidos a diferentes períodos de jejum para alimentos sólidos e para água de no máximo 2 horas antes da anestesia.

5.1. EM RELAÇÃO AO PONTO DA INJEÇÃO (Quadro 2):

Os animais foram submetidos a injeções de solução de corante e RM em três pontos diferentes da parede gástrica, assim descritos:

- PONTO A: localizado na incisura da pequena curvatura, aproximadamente a 1/3 da distância esôfago-pilórica, em relação ao esôfago.
- PONTO B: localizado horizontalmente em direção à grande curvatura a 3,0 cm do Ponto A, na parede anterior do corpo gástrico.
- PONTO C: localizado na parede anterior do corpo gástrico a 1,5 cm do Ponto B.

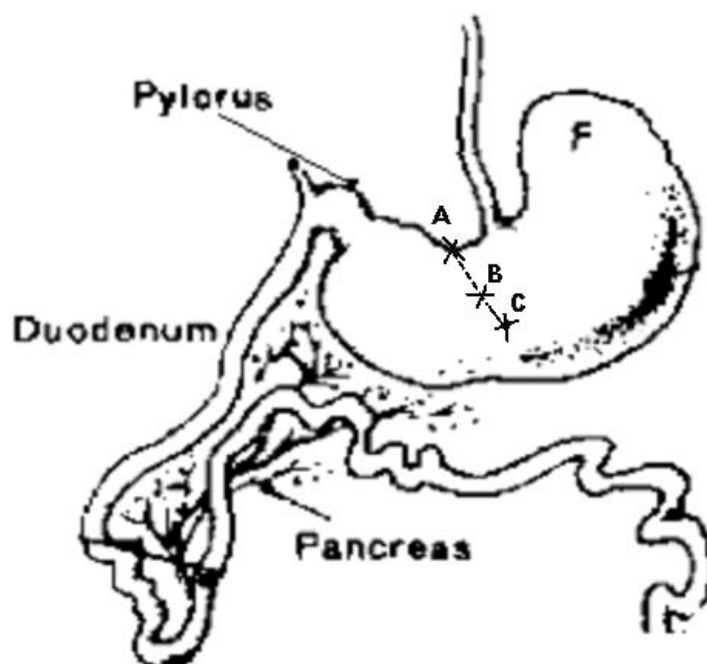


Figura 9. Representação esquemática da localização dos pontos A, B e C.
Legenda: A, B, C = respectivamente, localização dos pontos A, B e C; F = Fundo gástrico.

5.2. EM RELAÇÃO AO CORANTE E RADIOMARCADOR:

Ao realizar a punção e injeção do coelho 1 com 0,2 ml do RM e 1 ml de AzP, percebemos a formação de um nódulo submucoso com fissura em seu centro, devido à ruptura da mucosa gástrica, possibilitando a perda de RM e AzP para o lúmen do órgão com contaminação do conteúdo gástrico (Anexo 6 - 8.6.2 – Figura 22).

Posteriormente, para evitar tal situação, decidiu-se para os outros animais, diminuir o volume injetado do RM para 0,1 ml (entretanto, mantendo a quantidade de radioatividade aproximada prevista para o momento do experimento de 0,2 mCi) e do corante para quantidades inferiores a 0,25 ml (Quadro 2).

Quadro 2. Distribuição dos coelhos segundo jejum para alimentos, ponto de injeção do RM + AzP e tipo da solução do corante injetada.

COELHOS	J	PI	SUBSTÂNCIAS INJETADAS
1	6	A	RM = 0,2 ml c/ AzP= 1ml
2	4,5	B	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,25 ml
3*	8	B	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,2 ml
4	9	B	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,25 ml
5	4	C	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,1 ml + CA = 0,1 ml
6**	5,5	B	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,2 ml
7	4	B	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,2 ml
8	5	B	RM = 0,1 ml c/ AzP= 0,15 ml + CA = 0,1 ml

Legenda: J = jejum em horas; PI = ponto de injeção; RM = radiomarcador com 0,2 mCi de radioatividade detectável; AzP = Azul Patente 2,5%; CA = Carvão Ativado 0,5%.

* Em relação ao coelho 3: Ocorrência de nítida perfuração de parede gástrica durante punção. Assim, realizado punção e injeção de RM e AzP em outro ponto ao lado;

** Em relação ao coelho 6: No ponto B procurou-se injetar em orifícios diferentes o RM e o AzP, para verificar se talvez a somatória das substâncias pudesse justificar a formação de nódulo submucoso, entretanto, ao injetar-se o AzP percebeu-se vazamento de pequena quantidade deste, pelo orifício de punção do RM. Com isto, optou-se por sempre injetar o RM e AzP pelo mesmo orifício.

Devido a alguns autores, através de estudos em humanos (CATARCI et al., 1998; HAIGH et al., 2001; HUANG et al.; 2004) e animais (PEREIRA et al.; 2008) sugerirem que o carvão ativado melhoraria a sensibilidade de identificação dos linfonodos no trans-operatório, assim como durante o estudo histológico, resolvemos utilizá-lo, associado ao AzP, em alguns animais (Quadro 2), para aprender a manipulá-lo e testá-lo.

5.2. EM RELAÇÃO AO CARVÃO ATIVADO:

Baseado nos resultados apresentados por Pereira et al. (2008), escolheu-se a concentração do carvão ativado de 0,5%. Para sua preparação, segundo as informações cedidas pelo laboratório Labcenter – Materiais para Laboratórios, responsável pelo fornecimento do carvão ativado pó PA usado no estudo, o frasco de 500 gramas possuía as seguintes características técnicas:

Quadro 3. Características do Carvão Ativado PA:

CARACTERÍSTICAS	LIMITES	RESULTADOS
<i>pH susp. 1% / 25°C</i>	Pó fino, negro, inodoro	De acordo
<i>Constituintes não carbonizáveis</i>	5,0-11,0	9,89
<i>Poder descolorante</i>	Passa o teste	P.T.
<i>Sulfeto</i>	Passa o teste	P.T.
<i>Pureza</i>	99-100%	99,50%

Legenda: P.T. = Passa o teste.

Para chegar à concentração de 0,5% de carvão ativado, misturou-se 100 ml de água destilada com 0,5 gramas de pó de Carvão Ativado PA e após submeteu-se à ebulição. Depois foi armazenado em frasco escuro e utilizado no estudo através de volumes citados no Quadro 2.

5.3. RESULTADOS E PADRONIZAÇÃO PARA O ESTUDO DEFINITIVO:

Executada a PLN gástrica nos coelhos, ocorreu a identificação de 9 suspeitas de linfonodos, com confirmação histológica para tecido linfoide em 55,56% dos casos (Quadro 4).

Quadro 4. Distribuição dos coelhos segundo quantidade de SL identificadas no período intraoperatório com sua posterior confirmação histológica, assim como a descrição de possíveis acidentes ocorridos durante a punção do RM e corante na parede gástrica.

N	ACIDENTES NA PUNÇÃO	SL	Tipo LN	Confirmação SIM	Histológica NÃO	Observações
1A	Sim (roptura nóculo submucoso)	SL1	só Az		X	Ausência de linfonodo (TA)
2B	Não	SL1	AzR	X		Um (01) linfonodo
		SL2	AzR	2x		Dois (02) linfonodos
		SL3	só Az		X	Ausência de linfonodo (TA)
3C	Sim (perfuração da parede)	SL1	só Az		X	Ausência de linfonodo (TA)
4B	Necessidade de empurrar o embolo com mais força ocorrendo discreto respingamento do RM.	SL1	AzR	X		Um (01) linfonodo
		SL2	Só Az		X	Ausência de linfonodo (TA)
		SL3	Só Az		X	Ausência de linfonodo (TA)
5C	Presença de nóculo submucoso íntegro	SL1	só Az	X		Um (01) linfonodo
6B	Saída de azul pelo orifício da RM com maior área de Azul no sítio da punção*	SL1	AzR	X		Um (01) linfonodo
7B	Não	SL1	só Az	X		Um (01) linfonodo
8B	Não	SL1	só Az	X		Um (01) linfonodo
		SL2	só Az	X		Um (01) linfonodo
TOTAL		SL		9		
		TA			5	

Legenda: A = Injeção no ponto A; B = Injeção no ponto B; C = Injeção no ponto C; N = amostra de animais; SL = Suspeita de linfonodo; só Az = suspeita de linfonodo corado apenas em azul com presença de radioatividade ausente ou não significativa; AzR = suspeita de linfonodo corado em azul com presença de radioatividade significativa (> 10X BG inicial ou final), TA = presença de tecido adiposo. * = Presença de vazamento do azul pelo orifício do RM. OBS.: Coelhos 5 e 8 = foram injetados o AzP associado ao carvão ativado.

Quanto à localização e confirmação dos linfonodos, independente do ponto de injeção utilizado, foi possível identificar em todos os animais, com exceção dos coelhos 1 e 3, a presença constante do linfonodo fúndico periesofágico. Em consequência, percebeu-se que este seria provavelmente o principal linfonodo relacionado à drenagem da parede gástrica específica dessa região.

Ademais, para evitar interferência quanto à aferição da radioatividade com *gamma probe*, relacionada à topografia do linfonodo fúndico periesofágico, achamos imprópria à escolha do ponto A. Quanto aos pontos B e C, percebemos que o ponto B resultava em maiores suspeitas de linfonodos, assim como respectivas confirmações histológicas.

Com o passar das injeções, verificou-se que uma forma de evitar acidente de punção, seria caminhar com a agulha por alguns milímetros na camada subserosa, a partir do ponto de sua introdução. Como consequência, após o coelho 4, passou-se a introduzir a agulha por 5 mm na camada subserosa da parede gástrica, padronizando-a futuramente no estudo relacionado a esta tese.

Além disso, outras medidas para evitar acidentes de punção foram percebidas, como: necessidade de penetrar com a agulha na parede gástrica em ângulo inferior a 10° em relação à mesma, pinçar a serosa ao lado do ponto da punção com pinça delicada para melhorar sua visualização, retirar a agulha do AzP após sua injeção realizando aspiração delicada no final do ato e comprimir levemente por 5 min o orifício da aplicação do AzP e RM, obstruindo-o para evitar vazamentos. Essas, posteriormente foram padronizadas para uso durante a PLN gástricos nesta tese.

Quanto ao carvão ativado utilizado nos coelhos 5 e 8, no intra-operatório não existiu melhora na identificação das SL, assim como a médica-patologista do estudo, informou que não foi possível identificar partículas do minério nas espécimes submetidas ao estudo histológico, mesmo através de avaliação microscópica com aumento de até 1000X (imersão).

Outrossim, a farmacêutica do Hospital das Clínicas da FCM da Unicamp-SP responsável pelo preparo da solução de carvão ativado, informou que o minério é insolúvel a qualquer diluente (por exemplo água destilada, azul patente, etc.).

Em 2010, foi procurado o autor principal do estudo nacional (PEREIRA et al., 2008) que utilizou o AzP associado ao carvão ativado em ratos, para esclarecer as dúvidas relacionadas ao preparo da solução, que informou desconhecer como havia ocorrido o preparo da mesma, pois todo processo era de conhecimento exclusivo da farmacêutica responsável pelo estudo e que infelizmente havia perdido o seu contato.

Talvez o insucesso da identificação do carvão ativado nos dois coelhos testados no estudo piloto, possa ter sido atribuído a algum problema relacionado à proposta de tentativa de diluição, porém, visto insolubilidade do minério e a falta de informações metodológicas fornecidas pelo estudo de Pereira et. al (2008), tornou-se difícil uma possível reprodutibilidade de estudo semelhante.

Baseado nas dificuldades acima optou-se por não utilizar o carvão ativado nos experimentos relacionados a esta tese.

8.6 - ANEXO 6. ACERVO DE FOTOGRAFIAS

8.6.1. PESQUISA DE LINFONODOS

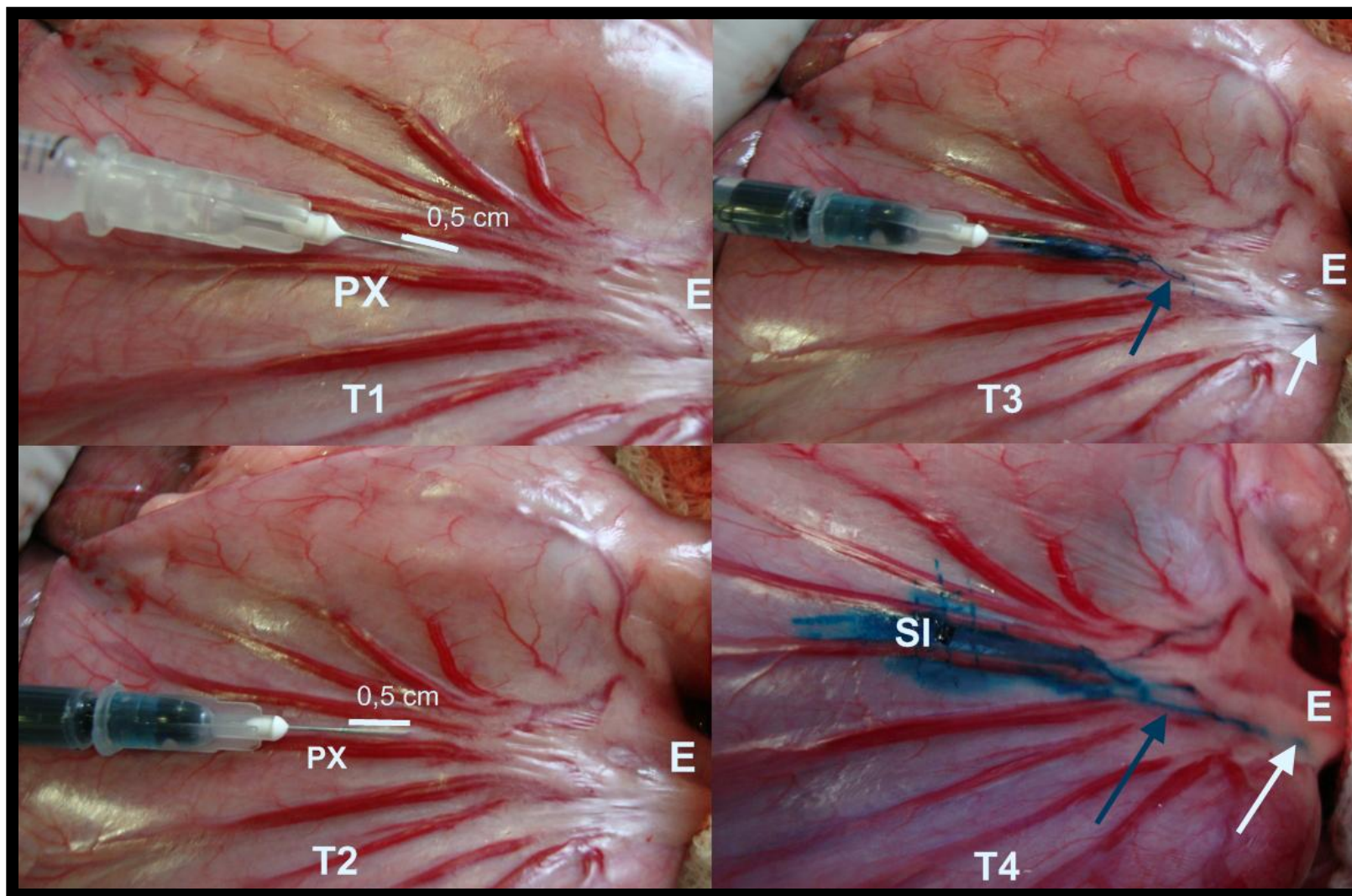


Figura 10. Fotografias, demonstrando injeções do RM e AzP (passo a passo), além da pesquisa de SL aos 10 minutos.

Legenda: PX = Ponto X; T1 = Tempo da injeção do RM; T2 = Tempo antes da injeção do AzP; T3 = Tempo final da injeção do AzP; T4 = Avaliação aos 10 minutos; E = Esôfago; Seta azul = Ducto linfático; Seta branca = Suspeita de Linfonodo esôfago-fúndico.

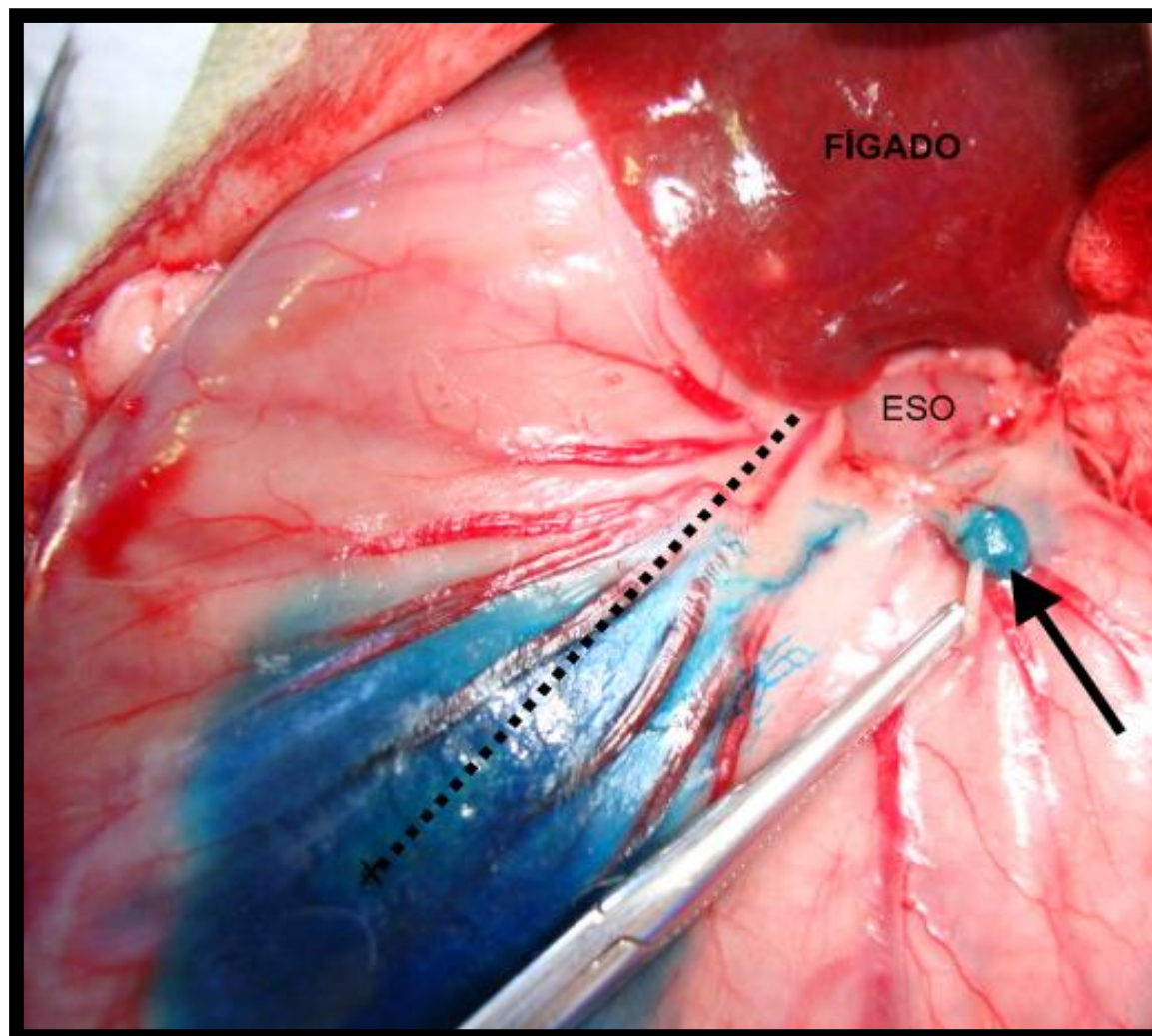


Figura 11. Fotografia demonstrando LN fúndico periesofágico azul-radioativo, durante avaliação aos 20 minutos, após realização de pequena dissecação do mesmo, para melhor visualização.

Legenda: ESO = Esôfago; Seta preta = SL confirmada como LN fúndico periesofágico azul-radioativo; Linha tracejada preta = Distância entre PX e pequena curvatura de 3,5 cm; X = Ponto X. Nota: Vejam que apesar do grande espanhamento do AzP, não ocorreu prejuízo para identificação do LN.

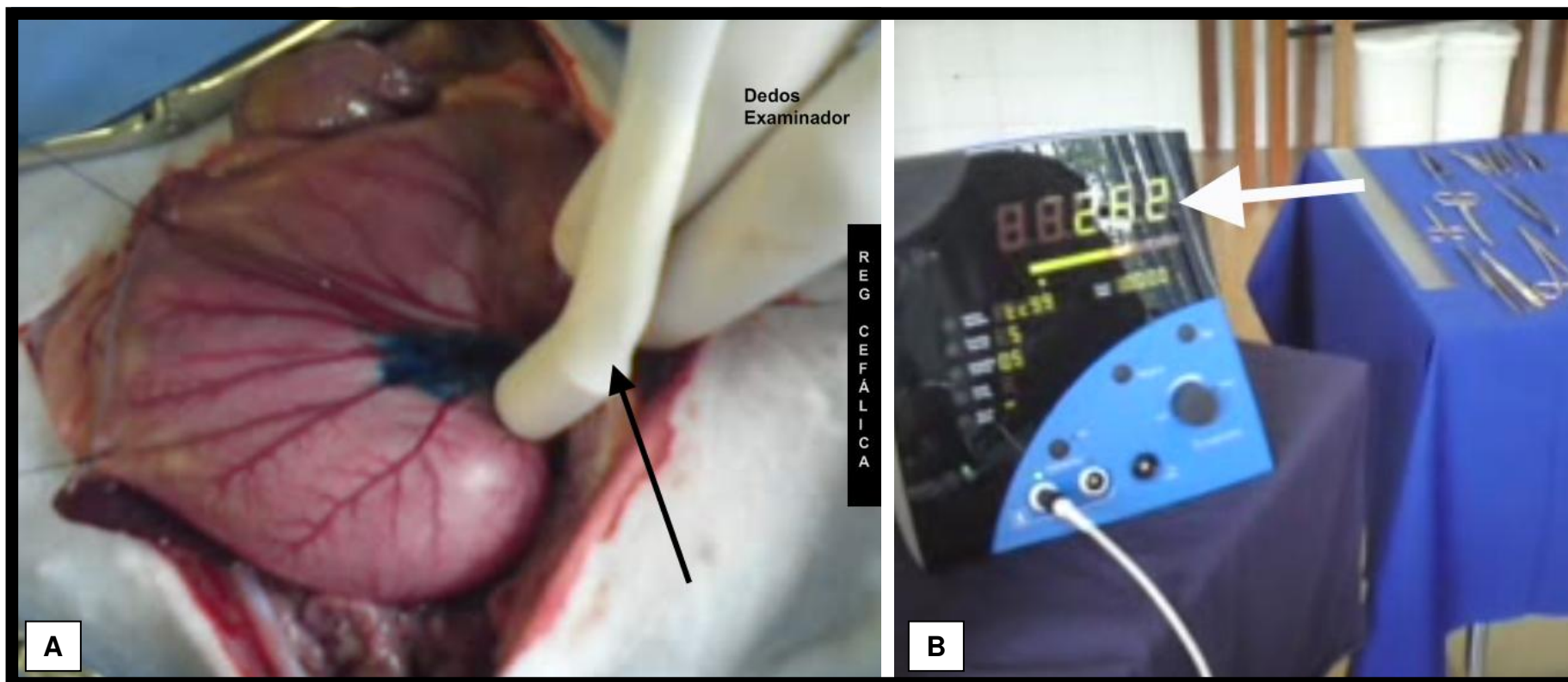


Figura 12. Fotografias demonstrando avaliação com o *gamma probe*, durante avaliação aos 20 minutos.

Legenda: REG = região; Seta preta = Aponta para sonda do *gamma probe* (coberta por dedo de luva de látex). Foto A = Demonstra a sonda avaliando e quantificando a radioatividade apresentada por uma suspeita de LN. Foto B = Demonstra o valor de radioatividade = 262 cps, apresentado no visor do *Europrobe*, durante a avaliação da suspeita de LN.

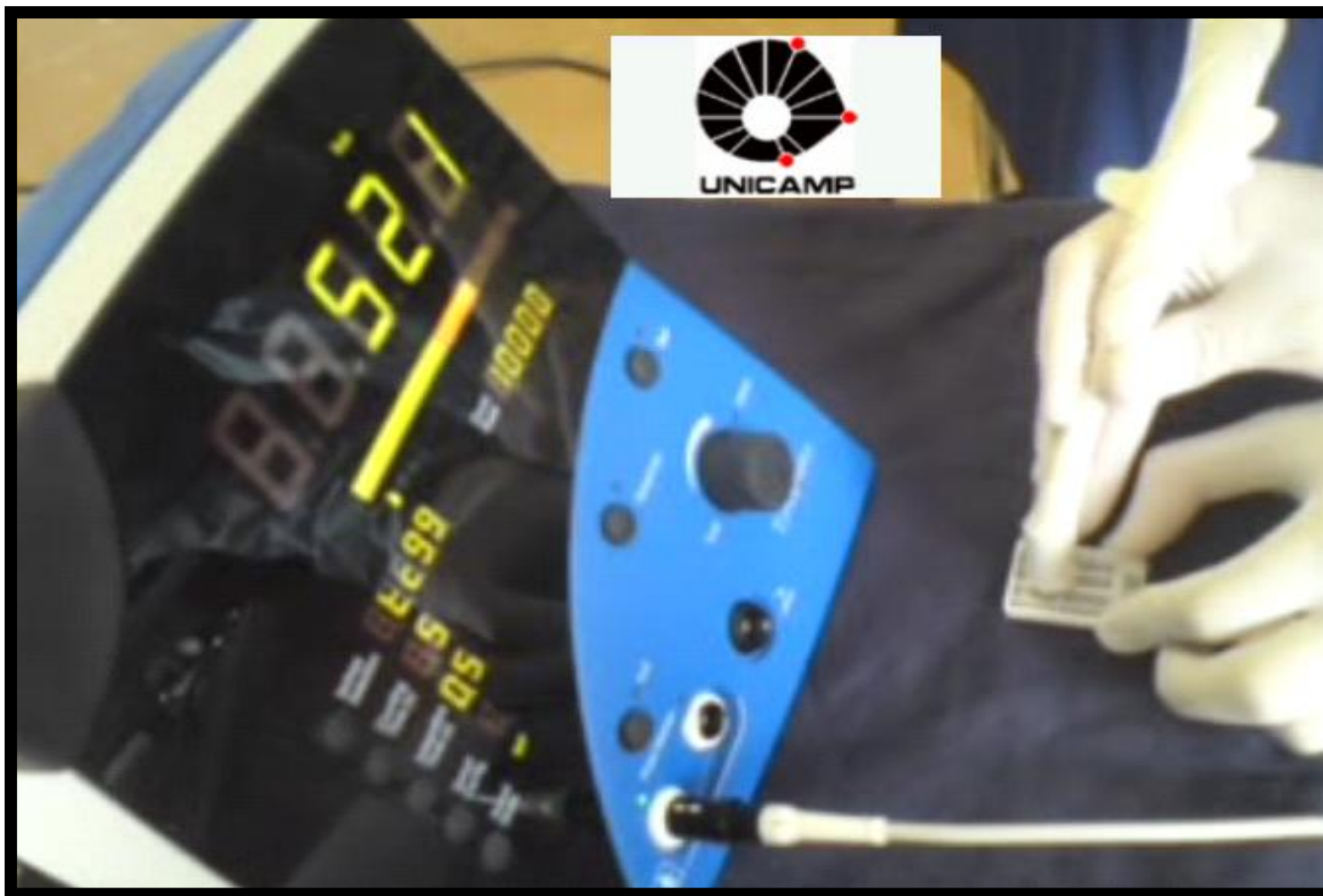


Figura 13. Fotografia demonstrando avaliação “ex vivo” de linfonodo em bancada com a sonda do *gamma probe*.

8.6.2. ICONOGRAFIA ACESSÓRIA



Figura 14. Mesa cirúrgica com instrumental pronto para iniciar o experimento.

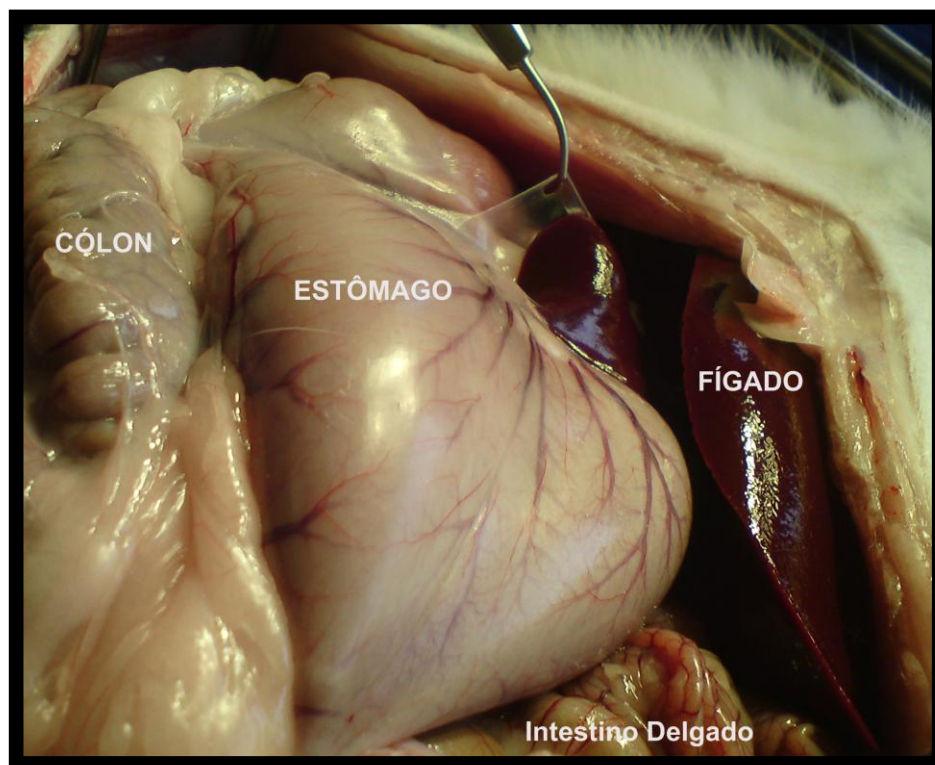


Figura 15. Fotografia demonstrando na ponta da pinça a presença de membrana hepatogástrica delgada, transparente, identificada em todos os animais.



Figura 16. Fotografia demonstrando a visão frontal do *Europrobe*[®] e respectiva sonda.

Fonte: Imagem *Europrobe*[®] (EURORAD, 2011) e sonda.

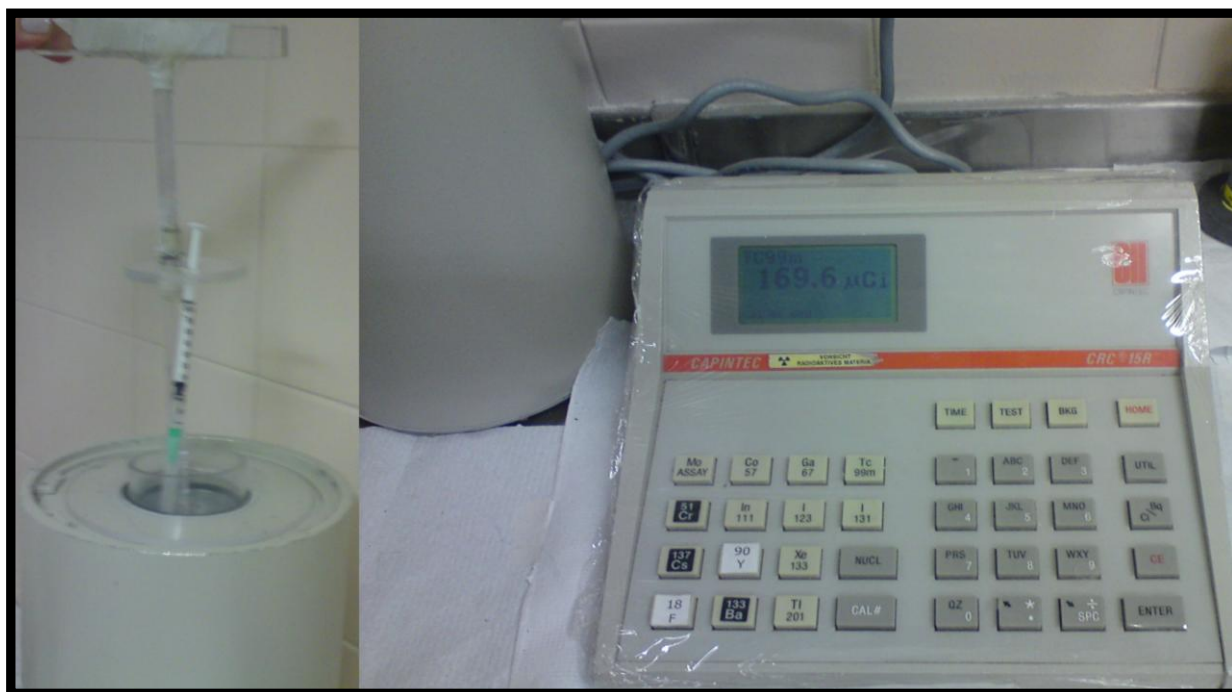


Figura 17. Aparelho usado para aferir e calibrar a radiomarcção do fitato de sódio com o ^{99m}Tc .

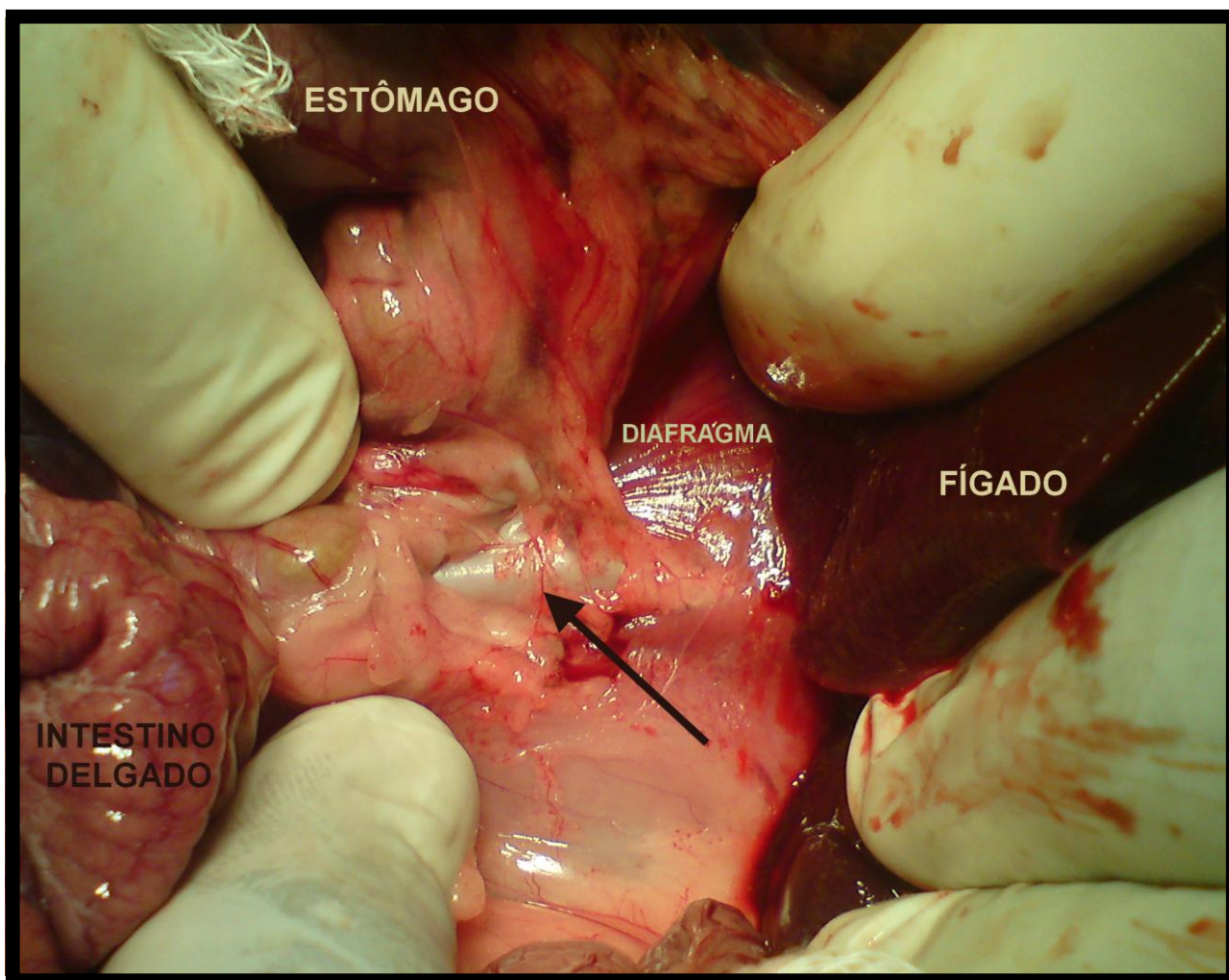


Figura 18. Fotografia demonstrando veia cava dissecada durante linfadenectomia pericaval. **Legenda:** Seta preta = Aponta para veia cava.

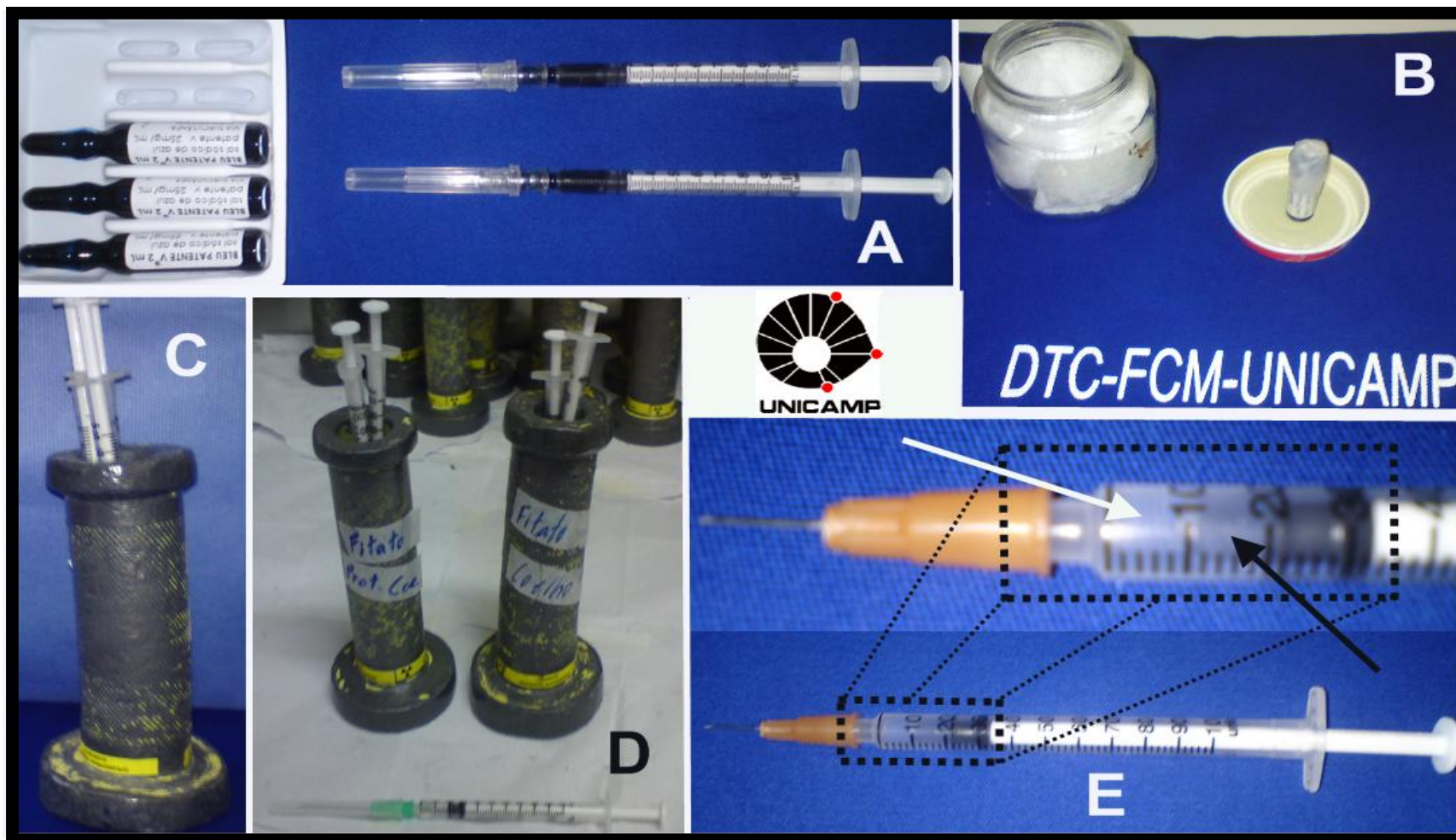


Figura 19. Apresentação e particularidades metodológicas do Azul Patente V[®] (Guerbert) 2,5% e radiomarcador (fitato – ^{99m}Tc).

Legenda: A = Demonstração de ampolas de AzP e este aspirado (0,2 ml) em seringas (tipo insulina) prontos para uso. B = Demonstração da forma a qual a ampola de AzP foi armazenada após violação para uso. Vejam que a ampola após uso foi vedada com plástico contacto associado ao armazenamento em frasco com tampa fechada, em geladeira, até o próximo dia de experimentos. C e D = Apresentação dos recipientes de chumbo as quais as seringas contendo RM eram transportadas do Departamento de Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da FCM/Unicamp-SP para o Laboratório (LTCCE). E = Demonstração de seringa (tipo insulina) contendo 0,1 ml de RM (0,2 mCi) (seta branca); a qual na visão ampliada percebe-se, indicado pela seta preta, presença de bolha de ar entre o embolo e o RM (cuidado padrão para todas as doses de RM objetivando evitar desperdícios do mesmo).

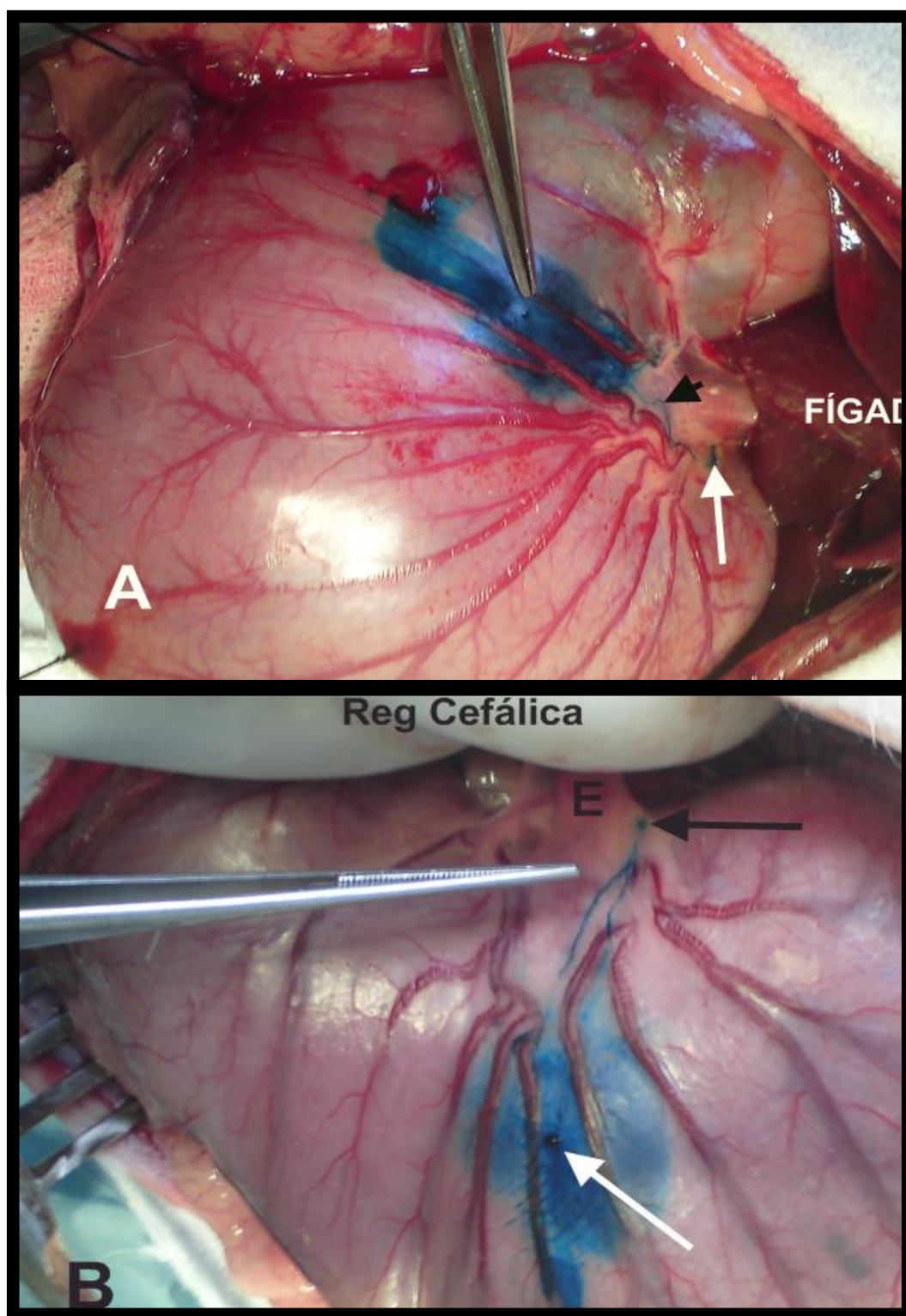


Figura 20. Fotografias demonstrando presença de acidentes de punção com pequena perda e espanhamento do RM/AzP no sítio da punção, mas sem prejuízo da avaliação das SL.

Legenda: **Figura 20A.** Na ponta da pinça anatômica temos o Ponto X. Seta preta = Ducto linfático; Seta Branca = Suspeita de linfonodo. **Figura 20B.** Temos a pinça anatômica mostrando os ductos linfáticos. Reg = região; E = esôfago; Seta preta = Suspeita de linfonodo; Seta branca = Ponto X.

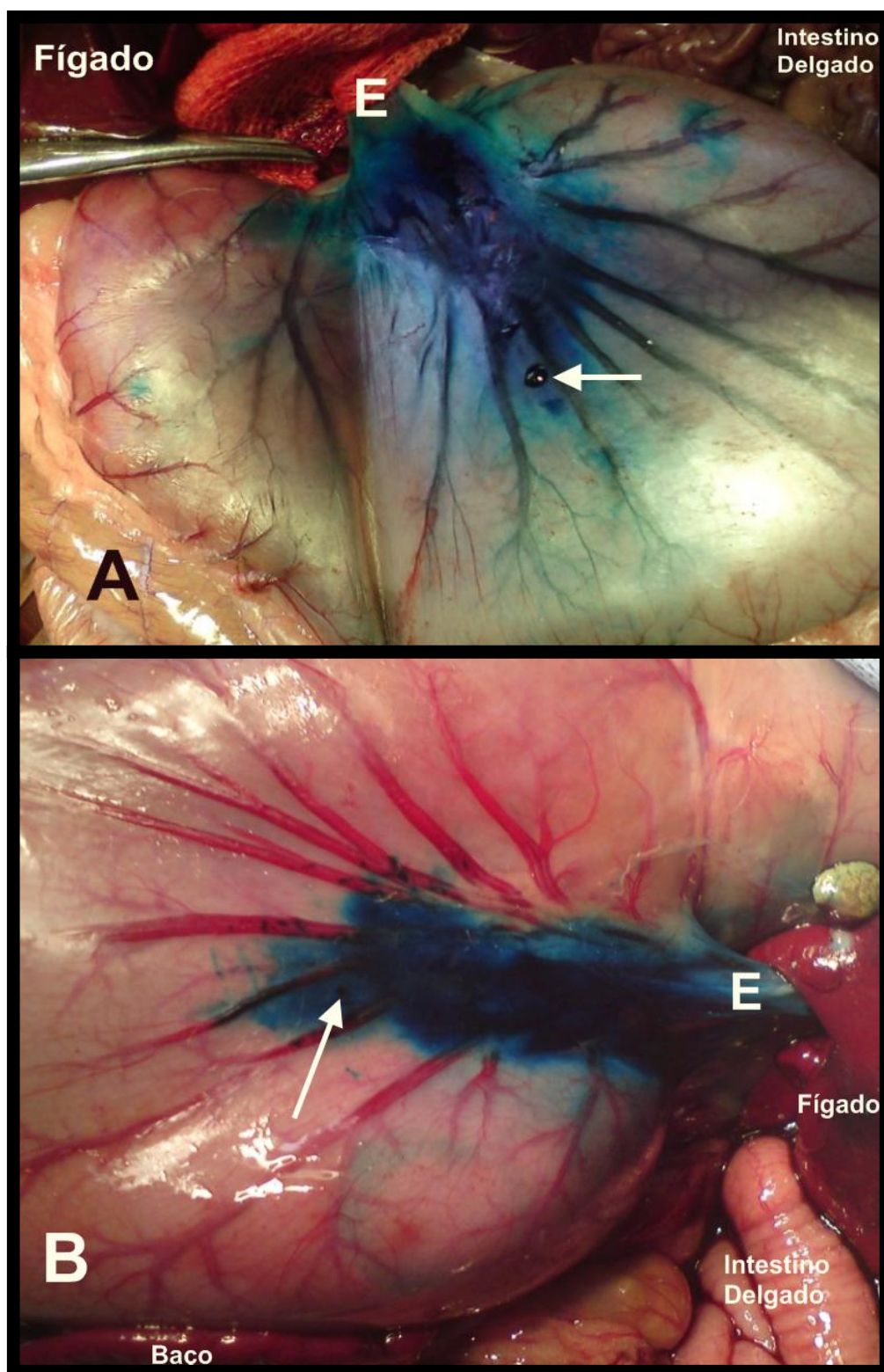


Figura 21. Fotografias demonstrando presença de acidentes de punção com grande espanhamento do RM/AzP no sítio da punção, prejudicando relativamente à avaliação das SL.
Legenda: **Figura 21A.** Estravazamento do AzP em grande quantidade devido pressionar com maior intensidade o PX. E = Esôfago; Seta branca = PX. **Figura 21B.** Grande espalhamento do AzP dificultando identificação das SL. E = esôfago; Seta branca = PX.

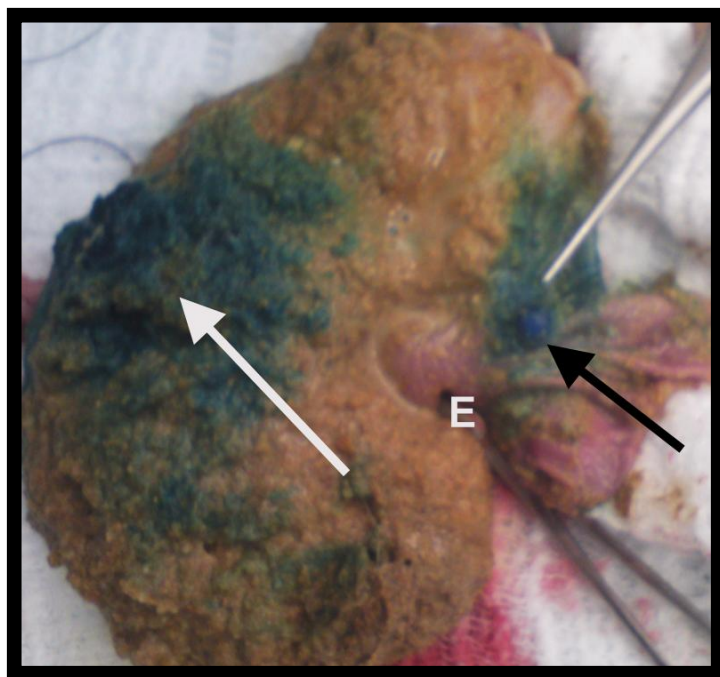


Figura 22. Fotografia com estômago aberto, em bancada, demonstrando presença de nódulo submucoso com fissura e consequente perfuração de parede gástrica, comprovada pelo tingimento do conteúdo gástrico com o AzP. **Legenda:** E = Óstio esofágico; Seta branca = Aponta para o conteúdo gástrico tingido de azul; Seta preta = Aponta para o nódulo submucoso.



Figura 23. Demonstração de linfonodo azul dissecado de 0,3 cm, sendo aferido com régua milimetrada, sobre uma gaze.

8.7 - ANEXO 7. ESTUDO HISTOLÓGICO

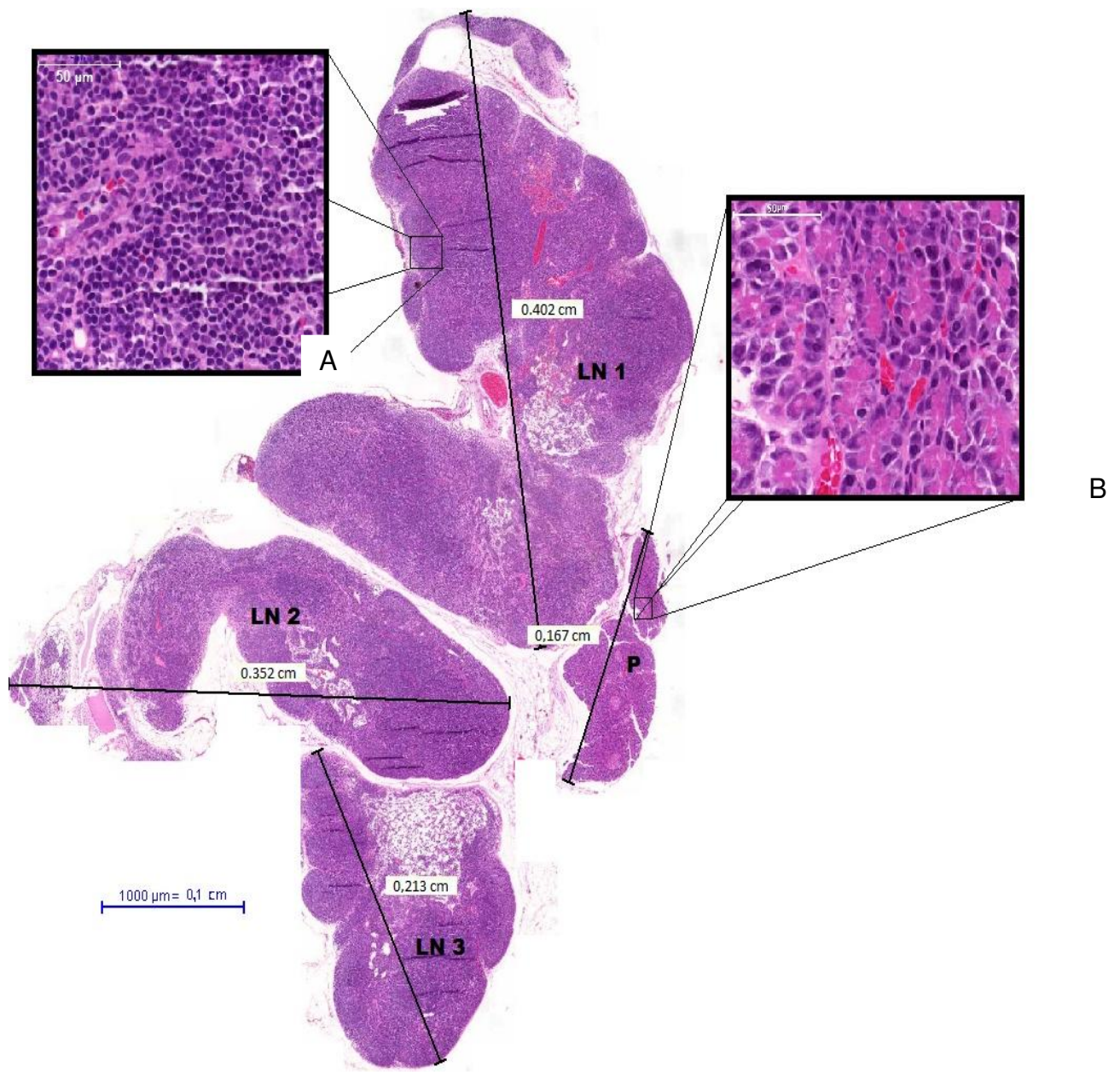


Figura 24. Lâmina com SL encaminhada para estudo histológico com H-E, demonstrando a presença de três linfonodos e fragmento de tecido pancreático.

Legenda: LN 1 = Linfonodo 1; LN 2 = Linfonodo 2; LN 3 = Linfonodo 3; P = Tecido pancreático; A = Em maior aumento evidência tecido linfóide repleto de linfócitos e alguns centroblastos; B = Em maior aumento evidencia ilhotas pancreáticas, caracterizando fragmento de pâncreas. Obs.: 1 cm = $10^4 \mu\text{m}$, assim LN 1 = 0,4 cm; LN 2 = 0,35 cm e LN 3 = 0,21 cm.

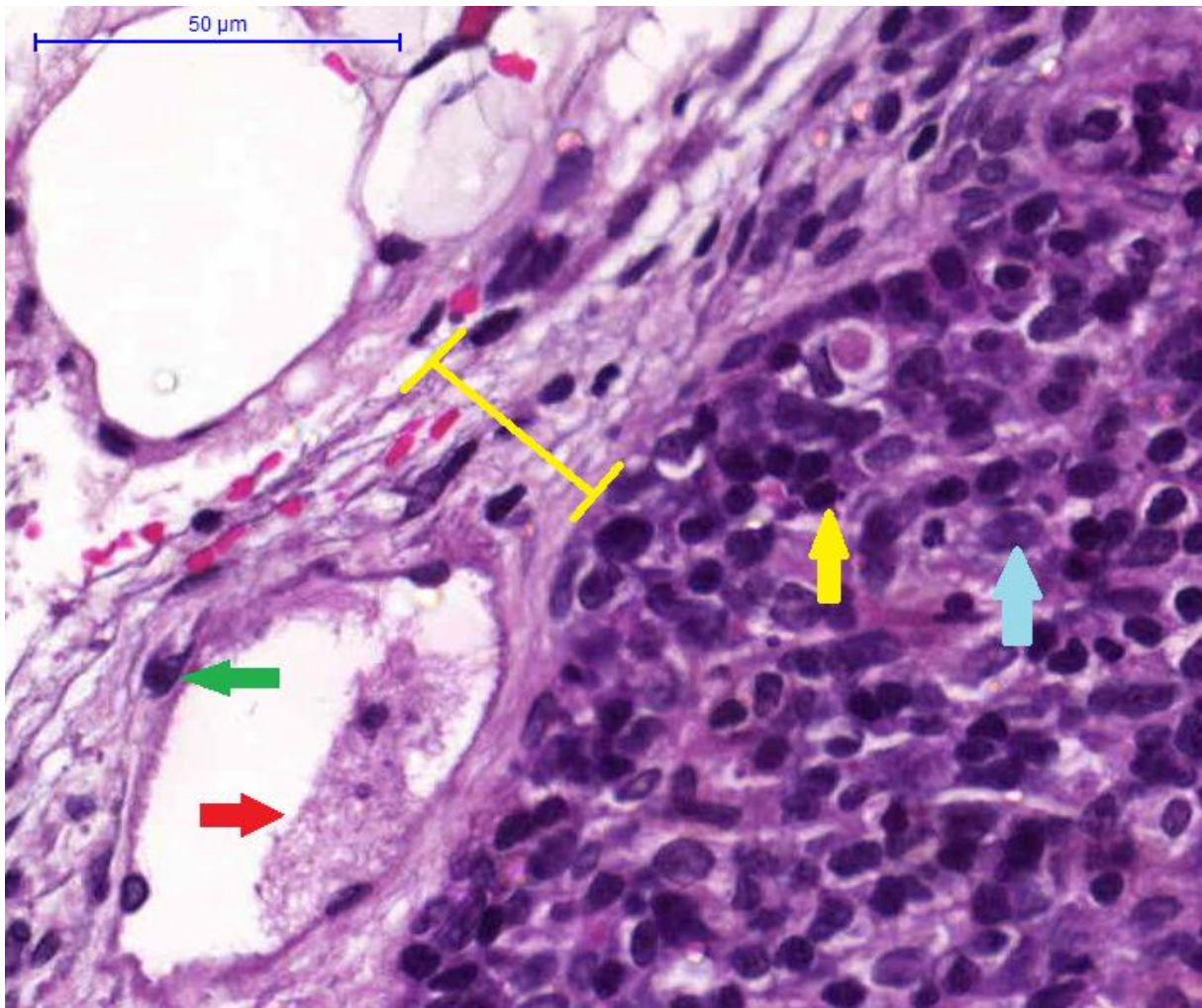


Figura 25. Lâmina de estudo histológico (H-E), demonstrando constituintes de um linfonodo, através de aumento igual a 400X.

Legenda: Setas – Verde = célula endotelial do ducto linfático; Vermelha = presença de linfa no interior do ducto linfático; Amarela = linfócito; Azul = centroblasto. Delimitado com barra amarela = Espessura da cápsula do linfonodo constituída de fibroblastos.

8.8 - ANEXO 8. COMPARAÇÃO DE ESTUDOS NA PLN
(MODELOS ANIMAIS)

ANEXO 8. Quadro 5- Comparação de estudos para criação e padronização de modelo animal experimental para pesquisa de linfonodos em estômago.

AUTORES	Méndez <i>et al.</i> (2003)	Kim <i>et al.</i> (2008)	Torres de Melo (2010)	Alves <i>et al.</i> (2012) (Estudo desta tese)
CARACTERÍSTICAS				
Animal (AN)	suínos	coelhos	cães (fêmeas)	coelhos (machos)
Amostra (N)	4	7	25	32
Método de PLNs	Combinado	Combinado	Combinado	Combinado
Local das punções	Submucosa (local ND)	Subserosa de corpo a 5 cm da da pequena curvatura gástrica	Seromuscular de antro na pequena curvatura gástrica a 1 cm do piloro	Subseroso de corpo a 3,5 cm da pequena curvatura gástrica
Substâncias injetadas (quantidade ml)	DTPA com AD (0,1ml/7,4 MBq) + azul de isosulfan 1% (0,1ml)	NFM (0,1 ml) e azul de isosulfan 1% (0,1ml)	99m Tc com fitato (0,2 ml/19 MBq) e azul patente 2,5% (0,2ml)	99m Tc com fitato (0,1 ml/7,4 MBq) + azul patente 2,5% (0,2ml)
Punção no mesmo ponto	Única	Separadas - em sequência	Separadas - > 20 min entre as punções	Separadas - em sequência
Tempo da avaliação dos LNs	5-10 min	3 - 4,2 min*	0, 5, 10, 15, 20 e 40 min**	5, 10 e 20 min
Tempo da linfadenectomia	5-10 min	ND	após 40 min	após 20 min
Método de identificação e confirmação de tecido linfático	Nenhum	Estudo histológico Hematoxilina-eosina	Nenhum	Estudo histológico Hematoxilina-eosina
Identificação de LNs na amostra radiomarcador / corante (%)	ND	ND Métodos combinados = 100%	80% / 96%	84,37% / 93,75% (Métodos combinados = 93,75%)
N. total de LNs identificados	8 LNs radiativo e 6 LNs azul***	****	27 LNs radioativos + 39 LNs azuis*****	70 linfonodos (métodos combinados)
Média N. de LNs identificados por animal	ND	****	1,08 radioativos / 1,56 azuis	2,19 linfonodos/animal (métodos combinados)
Localização mais frequente dos LNs (frequência %)	região celíaca	ND	LNs da pequena curvatura e infrapilóricos	LNs da região entre o esôfago e o fundo gástrico
N. falso-positivos	NPC*****	0 % (ND)	NPC*****	22,22%
Acurácia	NPC*****	100%	NPC*****	77,77%

LEGENDA:

DTPA = Ácido dietilentriamina pentaacético

AD = Amino-dextrano

MBq = Mega Becquerel

^{99m}Tc = tecnécio - ^{99m}

NFM = Nanopartículas fluorescentes magnéticas

NPC = Não passível de ser calculado visto ausência de confirmação histológica de tecido linfóide.

* Não estabeleceram tempo, apenas ficaram aguardando os linfonodos (LNs) tornarem-se azul ou fluorescente.

** Avaliações realizadas ao longo dos tempos apresentados.

*** Não definido critérios para considerar linfonodos radioativos.

**** Não passíveis de evidenciar devido ausência de descrição contida no resumo e restante do artigo escrito em japonês (por símbolos).

***** Linfonodos sem confirmação histológica.

8.9 - ANEXO 9. ANATOMIA DO
APARELHO DIGESTIVO DO COELHO

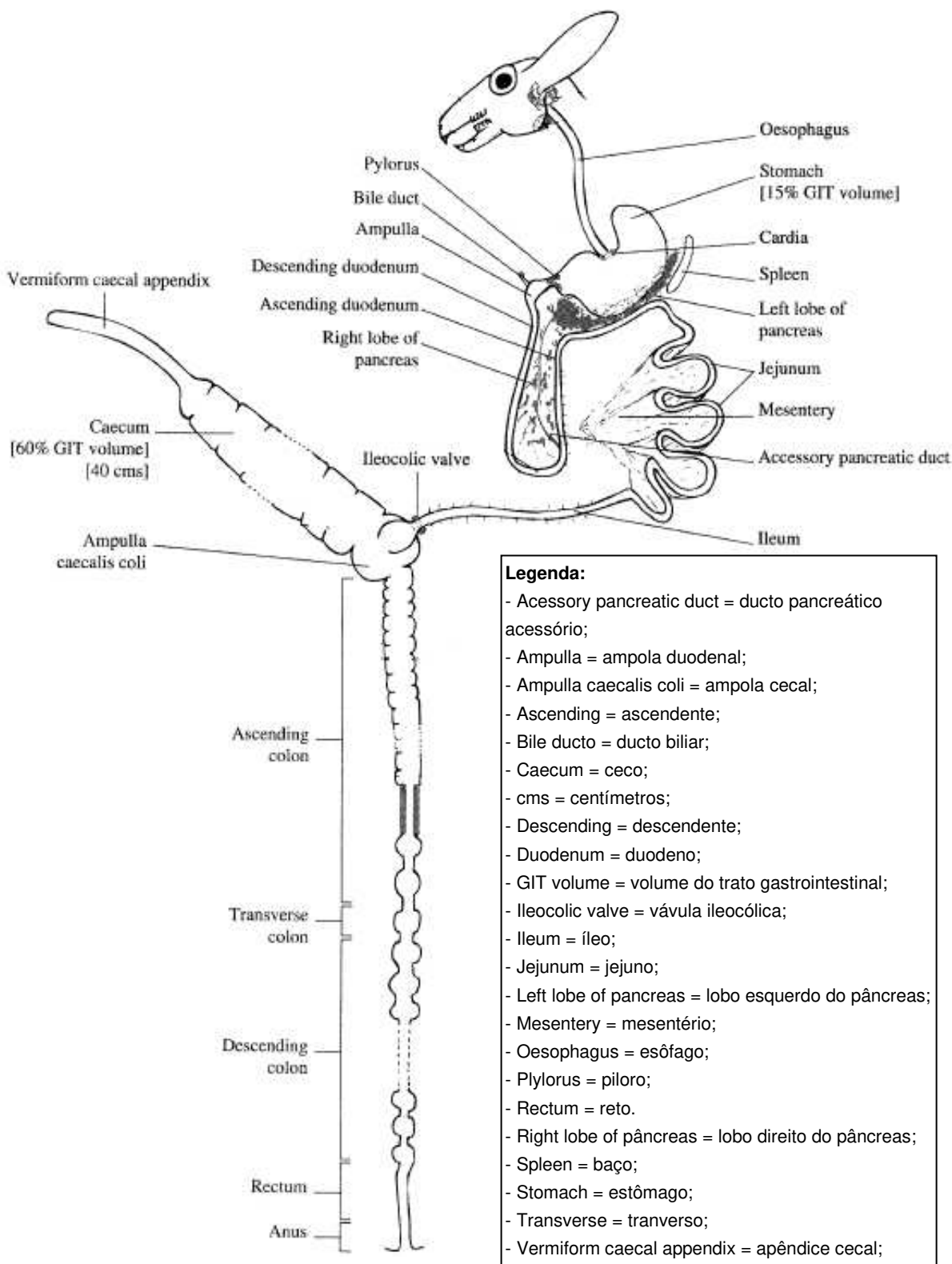


Figura 26- Anatomia do aparelho digestivo do coelho.

Adaptação baseada em figura retirada de Davies RR, Davies JAER. Rabbit gastrointestinal physiology. Vet Clin Exot Anim 2003; 6:139-153.

**8.10 - ANEXO 10. PRODUÇÃO
CIENTÍFICA RELACIONADA À TESE**

10. ARTIGOS

10.1. ARTIGOS PUBLICADOS

10.1.1. Alves JR, Lopes LR, Sasasaki T. Perioperative care in an animal model for training in abdominal surgery: is it necessary a preoperative fasting? Acta Cir Bras 2011; 26:541-48. Classificação Acta Cirúrgica Brasileira – WebQualis (2012) para área da Medicina III: versão impressa (ISSN 0102-8650) = A2 / versão online (ISSN 1678-2674) = B1. - Fator de Impacto (2011) = 0,2486.

**22 - ORIGINAL ARTICLE
TECHNICAL SKILL**

Perioperative care in an animal model for training in abdominal surgery. Is it necessary a preoperative fasting?¹

Cuidados perioperatórios em modelo animal de treinamento em cirurgia abdominal. É necessário jejum pré-operatório?

José Roberto Alves^I, Luiz Roberto Lopes^{II}, Tânia Sasasaki^{III}

^IFellow Master degree, Sciences of Surgery, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Main author, responsible for drafting the article and manuscript preparation, design, surgical procedures, collection and interpretation of data, statistical analysis and revision of study. The article is part of master thesis degree.

^{II}PhD, Chairman, Full Professor in Surgery, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Tutor, critical revision.

^{III}MD, Resident, Nuclear Medicine, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Helped with technical procedures.

Acta Cirúrgica Brasileira - Vol. 26 (6) 2011 - 541

RESUMO. OBJETIVO: Demonstrar que o coelho pode ser utilizado no treinamento em cirurgia, além de apresentar seus cuidados perioperatórios. **MÉTODOS:** Trinta e dois animais, com idade e peso respectivamente, entre 3 a 5,5 meses e 3000 a 4200 gramas, foram submetidos a variados tempos de jejum pré-operatório, anestesia intramuscular exclusiva (quetamina+xilasina), laparotomia com gastrectomia e esplenectomia totais. Dosou-se a glicemia sérica pré-operatória (inicial) e pós-cirúrgica (final), além de quantificado o conteúdo gástrico pós-gastrectomia. **RESULTADOS:** O procedimento anestésico-cirúrgico apresentou taxa de mortalidade de 3,125 % (1:32) e morbidade de 6,25 % (2:32). Evidenciou-se glicemia média inicial = 199,4 mg/dl e final = 326,1 mg/dl. Apesar de jejuns prolongados (mínimo de 2 horas para jejum absoluto e máximo de 8,5 horas para líquidos, e 20,5 horas para sólidos) todos os animais apresentaram no final do procedimento cirúrgico algum conteúdo gástrico e aumento da glicemia. Aqueles com jejum para líquidos e sólidos quando comparados com a quantidade de conteúdo gástrico sólido e total apresentaram grau moderadamente negativo de correlação linear. **CONCLUSÃO:** O coelho é um bom modelo para ser utilizado em treinamento de cirurgia, com baixa morbimortalidade, passível de ser anestesiado por via intramuscular, sem necessidade de jejum pré-operatório e ausência de hipoglicemia. **Descritores:** Experimentação Animal. Cirurgia. Jejum. Glicemia. Coelho.

10.2. ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

10.2.1. Alves JR, Lopes LR, de Meirelles LR, Ramos CD, Sasasaki T, Andreollo NA.

Animal model for training in sentinel lymph node biopsy of the stomach through combined methods. Programado para ser publicado na Revista Acta Cirúrgica Brasileira, edição n.12 (dezembro de 2012).

DECLARAÇÃO

DECLARO que o artigo intitulado **Animal model for training in sentinel lymph node biopsy of the stomach through combined methods¹** dos autores **José Roberto Alves^I, Luiz Roberto Lopes^{II}, Luciana Rodrigues de Meirelles^{III}, Celso Dario Ramos^{IV}, Tânia Sasasaki^V, Nelson Adami Andreollo^{VI}** foi aceito para ser publicado no **n.12, dezembro de 2012 da Revista ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA.**

Prof. Saul Goldenberg
Editor
Acta Cir Bras

11/08/2012

10.3. ARTIGOS EM PROCESSO DE SUBMISSÃO:

10.3.1. Alves JR, Lopes LR, Sasasaki T. Morphometric study in stomach of rabbits.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2012 (*in submission*). Classificação Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – WebQualis (2012) para área da Medicina Veterinária: versão impressa (ISSN 0102-0935) = A2 / versão online (ISSN 1678-4162) = A2. OBS.: Para área da Medicina III, temos versão impressa = B3. - Fator de Impacto (2011) = 0,2364. Data de início da submissão: 30/03/2012. Status atual: aguarda avaliação do Comitê Editorial.

FUNDAÇÃO ESTUDO PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA FEP MVZ EDITORA

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

CNPJ: 16.629.388/0001-24 Insc. Municipal: 302856.001-3
Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567 - 30123-970 Belo Horizonte MG
Fone: (31) 3409-2042 Fax: (31) 3409-2041
<http://journal.vet.ufmg.br> E-mail: abmvz.artigo@abmvz.org.br

Sr.(s): José Roberto Alves, Luiz Roberto Lopes, Tânia Sasasaki,

Cumpre-nos informar-lhe(s) que o artigo:

Estudo Morfométrico em Estômago de Coelho

enviado para publicação nesta revista, será encaminhado para análise do Corpo Editorial desde que não haja manifestação contrária de qualquer autor do trabalho e que a taxa de submissão esteja quitada.

REG.: 5539/2012

Recebido em: 30/03/2012

Atenciosamente,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

10.4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

10.4.1. PUBLICAÇÃO EM ANAIS:

10.4.1.1. *Alves JR*, Sasasaki T, Ramos CD, Meirelles LR, *Lopes LR*. Modelo animal para treinamento em pesquisa de linfonodo sentinela em estômago através de métodos combinados: corante e radiofármaco. Apresentado em forma de pôster e publicado resumo no Livro da 5ª Semana de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (Evento realizado na Unicamp-SP durante período de 09 a 12 de maio de 2011).

10.4.1.2. *Alves JR*, Sasasaki T, Ramos CD, Meirelles LR, *Lopes LR*. Modelo experimental em coelhos para pesquisa de linfonodo sentinela do estômago através de duplo método – corante e pesquisa radio-guiada. Apresentado em forma de apresentação oral e publicado no ASTM CODENT GAEDOW – Anais da X Semana Brasileira do Aparelho Digestivo 2011; 30(4):210.

10.4.2. PARTICIPAÇÕES VARIADAS:

10.4.2.1. *Alves JR*, Sasasaki T, Ramos CD, *Lopes LR*. Modelo experimental em coelhos para pesquisa de linfonodo sentinela do estômago através de duplo método – corante e pesquisa radio-guiada. Trabalho apresentado em forma de apresentação oral no XXIX Congresso Brasileiro de Cirurgia (21 a 25 de agosto de 2011), em Fortaleza - CE.

10.4.2.2. *Alves JR*, Sasasaki T, Ramos CD, Meirelles LR, *Lopes LR*. Modelo animal para treinamento em pesquisa de linfonodo sentinela em estômago através de métodos combinados: corante e radiofármaco. Trabalho apresentado em forma de pôster no Congresso da Associação Latino-americana de Sociedades de Biologia e Medicina Nuclear (28 setembro a 1 de outubro de 2011), em Porto das Galinhas – PE.

10.4.2.3. *Alves JR*, Sasasaki T, Ramos CD, Meirelles LR, *Lopes LR*. Modelo experimental em coelhos para pesquisa de linfonodo sentinela do estômago através de duplo método – corante e pesquisa radio-guiada. Apresentado em forma de apresentação oral na X Semana Brasileira do Aparelho Digestivo 2011 (19 a 24 novembro de 2011), em Porto Alegre – RS.