



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

**CAMMYLA SOUZA DE SÁ ROCHA
NILSON SHINICHI YOSHINO**

**ANÁLISE DE LAVADOS PERITONEAIS PELA CITOMETRIA DE FLUXO DE
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

BELÉM

2022

CAMMYLA SOUZA DE SÁ ROCHA

201609740081

NILSON SHINICHI YOSHINO

201609740138

TURMA CD/2016

**ANÁLISE DE LAVADOS PERITONEAIS PELA CITOMETRIA DE FLUXO DE
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção de grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Ishak.

BELÉM

2022

CAMMYLA SOUZA DE SÁ ROCHA

NILSON SHINICHI YOSHINO

**ANÁLISE DE LAVADOS PERITONEAIS PELA CITOMETRIA DE FLUXO DE
PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina pela
Universidade Federal do Pará**

Banca examinadora

Dr Geraldo Ishak

Dr Paulo Assumpção/UFPA

Dr Rommel Burbano/UFPA

Aprovado em: ___/___/_____

Conceito: _____

RESUMO

Introdução: O câncer gástrico é uma das principais neoplasias da atualidade, sendo o 4º tipo mais comum do mundo. Os tratamentos para tal moléstia variam conforme a classificação do grau da doença. Muitas vezes pode ocorrer a carcinomatose peritoneal, ou seja, a disseminação na cavidade peritoneal de células tumorais livres. O diagnóstico e tratamento deste grau do adenocarcinoma ainda está em discussão a fim de se encontrar métodos reprodutíveis e confiáveis. Neste trabalho, estudamos como tais alternativas a Citometria de Fluxo como diagnóstico e a lavagem peritoneal extensiva como tratamento. **Metodologia:** foi feita a contabilização das células tumorais livres em cada momento do processo de gastrectomia nas 3 etapas de lavagem peritoneal, sendo elas as seguintes: uso de 1 Litro de Soro Fisiológico no momento de abertura da cavidade (1º Lavado); 1 Litro logo após a ressecção do conteúdo afetado (2º Lavado) e então 9 Litros após troca de luvas (3º Lavado). Em cada etapa foram retirados 20 mL do resultado das lavagens e analisados em Citômetro de Fluxo, com marcação de fluorocromos CD326 e CD45, e então realizado o cálculo de Razão entre Células Tumorais e Leucocitárias (*Tumor cells/Leukocytes Ratio - TLR*). **Resultados:** obtivemos um resultado de um TLR intermediário no 1º Lavado, alto no 2º e baixo no 3º, com diferença significativa segundo testes não-paramétricos (teste de Kruskal-Wallis e comparação de Student-Newman-Keuls). **Conclusão:** concluímos que: 1 - sempre houveram precursores metastáticos na cavidade peritoneal antes da mobilização dos tecidos; 2 - após a cirurgia de ressecção do tumor há um número expressivamente maior de precursores metastáticos na cavidade; 3 - com a Lavagem Peritoneal Extensiva há menor quantidade de células tumorais livres na cavidade que antes do procedimento cirúrgico e promove uma expressiva queda nos registros de tais linhagens em comparação com o 2º lavado, podendo assim contribuir com menores chances da metastização tumoral e melhor qualidade de vida e desfechos clínicos.

Palavras-chave: câncer gástrico, citometria de fluxo, carcinomatose peritoneal, lavado peritoneal.

ABSTRACT

Background: Gastric cancer is one of the main tumors in actuality, being the 4th most common in the world. The treatments for such disease vary according to classification and degree of disease. Peritoneal metastasis, which is peritoneal cavity dissemination of free tumor cells, can often occur. The diagnosis and treatment of this degree of adenocarcinoma is

still being discussed in order to find more reproducible and reliable methods. This paper analyzes flow cytometry as an alternative for diagnostics and extensive peritoneal lavage as treatment. **Methods:** A counting of free tumor cells via flow cytometry was made in each moment of the gastrectomy in the 3 steps of peritoneal lavage, which are the following: 1 liter of physiological saline was used at the moment of opening of the abdominal cavity (1st lavage); 1 liter right after resection of the tumor (2nd lavage) and 9 liters after changing sterile gloves (3rd lavage). In each step, 20 mL were withdrawn from the lavage and analyzed through flow cytometry, with staining of fluorochromes CD326 and CD45 and then the Tumor Cells/Leukocytes Ratio - TLR was calculated. **Results:** An intermediate TLR was obtained in the 1st lavage, a higher TLR on the 2nd and a lower TLR on the 3rd, with statistically significant difference between groups. Non parametric tests were used for statistical analysis (Kruskall-Wallis test and Student-Newman-Keuls comparison test). **Conclusion:** We have concluded that: 1 - there were metastatic precursors in the peritoneal cavity before tissue mobilization in all patients; 2 - after the tumor resection surgery, there was an expressively larger number of metastatic precursors in the cavity; 3 - with extensive peritoneal lavage there was a smaller quantity of free tumor cells compared to before the surgical procedure, promoting an expressive decrease on the registers of such cell lineage comparing to the 2nd lavage, possibly contributing to reduced chances of peritoneal metastization and a better quality of life and clinical outcomes.

Keywords: Gastric cancer, flow cytometry, peritoneal metastasis, extensive peritoneal lavage.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	3
PROBLEMA	4
HIPÓTESES	4
OBJETIVOS	4
Objetivo Geral	4
Objetivos Específicos	5
JUSTIFICATIVA	5
REFERENCIAL TEÓRICO	6
CASUÍSTICA E MÉTODO	15
TIPO DE ESTUDO	15
AMOSTRA E POPULAÇÃO	15
AMBIENTE DE PESQUISA	16
COLETA DE DADOS	16
ANÁLISE DOS DADOS	16
ASPECTOS ÉTICOS – RISCOS E BENEFÍCIOS	17
RESULTADOS	17
DISCUSSÃO	21
REFERÊNCIAS	24
APÊNDICE A	26
APÊNDICE B	29

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2020, 29.824 pacientes foram internados em hospitais devido neoplasia maligna do estômago, além disso, Sitarz et al (2018), o câncer gástrico mundialmente apresentou 989.600 novos casos em 2008, sendo o quarto tipo de câncer mais comum no mundo, além da segunda causa de morte por câncer mundialmente (738.000 morte anualmente).

Sendo assim, podemos perceber a importância e necessidade de estudos em relação ao tratamento cirúrgico, com o objetivo de melhorar não só a taxa de cura, como também reduzir a taxa de recidivas malignas, sendo uma das mais comuns e mais perigosas a carcinomatose peritoneal, com os piores indicativos prognósticos. (BALFOUR, 1937; KURAMOTO et al., 2009)

A metástase peritoneal é completada com a implantação de células livres cancerígenas provenientes de tumores invasivos da serosa. A necessidade de prevenir a fixação e a progressão de tais células no peritônio dos pacientes é de suma importância, e a técnica utilizada atualmente é a Lavagem peritoneal intraoperatória extensa. Desta maneira, a cavidade peritoneal é lavada e aspirada com solução salina aquecida diversas vezes durante os tempos cirúrgicos. Alguns estudos apontam a potencialidade de redução das células cancerígenas livres em até zero, usando métodos de detecção de ácidos nucleicos. Em um outro estudo do Centro de Câncer da Universidade de Sun Yat-sen, na China, mostrou resultados compatíveis com a diminuição da incidência significativa de complicações pré-operatórias em relação à ressecção gástrica isolada. (GUO et al., 2019; KURAMOTO et al., 2009)

Em um outro estudo em Hong Kong, foram comparadas três técnicas de análise laboratorial: a citologia oncótica, a imunológica RT-qPCR e a citometria de fluxo, pesquisando ativamente células cancerígenas livres no líquido peritoneal. A sensibilidade e especificidade da citologia foram 40% e 100% respectivamente, enquanto o RT-qPCR foram de 80% e 100% e a citometria de fluxo foram de 100% e 80%, identificando a citometria como um método rápido, reprodutível e confiável para detecção de células tumorais no fluido peritoneal, combinando a especificidade da análise morfológica e a sensibilidade da análise

molecular. O resultado mostrado de 80% na especificidade da citometria de fluxo foi referido pelos autores como um falso positivo causado pela expressão do marcador EpCAM - único a ser utilizado no estudo – por células estromais e reativas, assim podendo ser melhorado utilizando outros marcadores epiteliais expressos no câncer gástrico. (JAGRIC et al., 2016)

Neste estudo procuramos utilizar o método da citometria de fluxo com marcadores de câncer gástrico de ótima sensibilidade e especificidade de forma a estudar com alta performance a eficiência da lavagem intraperitoneal extensa.

1.1. PROBLEMA

O uso da técnica de lavados gástricos em gastrectomias totais e subtotais melhora o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma gástrico, reduzindo a possibilidade de metástase?

1.2. HIPÓTESES

H0 - Hipótese nula: O estudo dos lavados gástricos de pacientes com neoplasia gástrica com o citômetro de fluxo não demonstra reduções estatisticamente significantes de células malignas ao longo das várias lavagens gástricas, demonstrando assim não haver benefício no uso da técnica de lavagem peritoneal em gastrectomias totais e subtotais.

H1 - Hipótese alternativa: O estudo dos lavados gástricos de pacientes com neoplasia gástrica com o citômetro de fluxo demonstra uma redução estatisticamente significativa de células malignas ao longo das várias lavagens gástricas, demonstrando assim redução do risco de metástase devido manipulação da peça cirúrgica.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo Geral

- Analisar dados colhidos pelo citômetro de fluxo de amostra tecidual de lavado peritoneal de pacientes com adenocarcinoma gástrico

1.3.2. Objetivos Específicos

- Comparar os dados fornecidos por um citômetro de fluxo e os de citologia oncótica;
- Comparar a quantidade de células neoplásicas entre os lavados gástricos iniciais e finais do procedimento cirúrgico;
- Comparar a apresentação clínica e sintomatologia e os dados fornecidos pela análise do citômetro de fluxo

1.4. JUSTIFICATIVA

Considerando a carcinomatose peritoneal como uma das recidivas e metástases mais comuns do câncer gástrico, além do mau prognóstico causado por tal condição, se pudéssemos avaliar os lavados gástricos com uma melhor técnica de análise laboratorial, é possível afirmar se essa técnica cirúrgica facilmente reproduzível em diversos cenários contribuiria para uma melhora prognóstica e uma escolha de tratamento mais eficaz para o paciente com adenocarcinoma gástrico a longo prazo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CÂNCER GÁSTRICO

O câncer de estômago é a patologia oncológica em que há o crescimento anormal de células gástricas, e ocorre normalmente a partir de células da camada mucosa na forma de rompimentos - ulcerações. São três tipos histológicos principais: adenocarcinoma (95% de todos os tumores), linfoma e leiomiossarcoma. (GONÇALVES et al., 2020).

70% dos pacientes diagnosticados têm mais de 50 anos e é mais comum em homens, com uma proporção de 3:1. No Brasil, a incidência do câncer gástrico está em terceiro lugar entre homens e quinto entre mulheres. Há uma tendência de redução em relação ao mundo, acreditando-se ser por melhores condições de saneamento básico, assim diminuindo o número de infecções por *Helicobacter pylori*; porém há uma tendência proporcional de aumento do tipo tumor de cárdia – relacionado a obesidade e a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). O impacto dietético e ambiental é importante no desenvolvimento do câncer gástrico. (GONÇALVES et al., 2020; NEVES et al., 2021)

Há uma forte correlação do câncer de estômago com fatores alimentares, tabagismo, etilismo e hereditariedade. Dentre os fatores exógenos com maior causalidade é uma dieta com altos níveis de sal (NaCl) e conservantes como nitrito e nitrato presentes amplamente em defumados e em frituras. Geralmente são estes os responsáveis por mudanças na estrutura da mucosa gástrica inicial. (GONÇALVES et al., 2020)

Existem vários sistemas de classificação do câncer gástrico, baseados na macroscopia e na microscopia. A da Organização Mundial da Saúde (OMS) se baseia nas características morfológicas, dividindo em cinco categorias principais – adenocarcinoma, carcinoma de células adenoescamosas, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado e carcinoma não classificado. Os adenocarcinomas são subdivididos em quatro tipos de acordo com seu padrão de crescimento – papilar, tubular, mucinoso e anel de sinete. Apesar de amplamente empregado, esse sistema não acrescenta no tratamento do paciente, além de que inúmeros tipos de cânceres não se encaixam nessas características. (TOWNSEND, 2014)

Macroscopicamente, há a classificação morfológica de Borrmann, para casos avançados, com uniformidade endoscópica (ARAÚJO; SOUZA; YAMANAKA, 2013; SCHLIOMA ZATERKA; NATAN EISIG, 2016):

- **Tipo I:** polipóide, exofítico, papilar ou vegetante, com lesões que se projetam para a luz gástrica;
- **Tipo II:** úlceras com mais de 3 cm de diâmetro, bordas elevadas e irregulares, sem infiltração do tecido vizinho;
- **Tipo III:** úlcero-infiltrativo, com bordas menos salientes de difícil delimitação, disseminação parcialmente difusa;
- **Tipo IV:** infiltração neoplásica difusa de um segmento ou de toda a parede, com ulcerações de profundidade variável. Pode apresentar *Linitis plastica*, com lesão envolvendo todo o órgão, tornando suas paredes rígidas.

Porém o sistema mais útil e amplamente utilizado é a classificação de Lauren em 1965, dividindo o adenocarcinoma gástrico nos tipos **intestinal** e **difuso**, com base na histologia, sendo que cada um tem distinta patologia, epidemiologia e prognóstico. (TOWNSEND, 2014)

O intestinal é o mais comum mundialmente, em pacientes de maior idade e do sexo masculino. Seu agente etiológico é o *H pylori*, e a sua morfogênese é baseada em um longo período inflamatório causado pela infecção, implicando na atrofia da mucosa gástrica e metaplasia intestinal das glândulas no Antro ou Cárdia. A metaplasia então pode progredir à neoplasia intraepitelial, intramucosa e adenocarcinoma invasivo, respectivamente. É mais comum encontrá-lo com classificação de Borrmann tipos I e II e tende mais a metástase hematogênica. Seus tipos histológicos são Adenocarcinoma Tubular e Adenocarcinoma Papilar. (SERGIO GUZMÁN; ENRIQUE NORERO, 2014; STRONG, 2015; TOWNSEND, 2014)

Já o tipo difuso possui uma maior correlação com fatores hereditários, mais comum em pacientes mais jovens, distribuído igualmente entre os sexos, e surge a partir de células isoladas ou ilhadas indiferenciadas sem formação de glândulas - importante uma ressalva quanto à formação de lagos de mucina intracelulares e a formação das Células em Anel de

Sinete, uma característica da lesão precursora: Carcinoma de células em Anel de Sinete *in situ*, geralmente no fundo gástrico. É mais comum em Borrmann III e IV (*Linitis Plastica*) e tende a carcinomatose peritoneal. Seus tipos histológicos são Adenocarcinoma de células em Anel de Sinete, Carcinoma Indiferenciado e Carcinoma Mucinoso. (SERGIO GUZMÁN; ENRIQUE NORERO, 2014; STRONG, 2015; TOWNSEND, 2014)

As primeiras manifestações clínicas do adenocarcinoma gástrico são vagas e inespecíficas, o que dificulta o diagnóstico precoce da doença quando está em um estágio potencialmente curável. Os sintomas mais comuns são perda de peso, dor abdominal epigástrica (a qual tende a ser mais severa e constante com o passar do tempo) plenitude pós-prandial, disfagia (principalmente em tumores na junção gastroesofágica e próximos à cárdia, podendo desenvolver síndrome pseudoacalásica) e náusea. Ao exame físico apenas sintomas de formas avançadas são notados, como caquexia, icterícia, palidez cutânea, massas palpáveis, ascite e edema de membros inferiores. Pode haver disseminação em estruturas subjacentes como pâncreas, fígado e cólon. Neste último, podem aparecer vômitos fétidos e fecalóides. Na disseminação linfática destaca-se especialmente os linfonodos palpáveis na fossa supraclavicular esquerda, sinal conhecido como gânglio de Virchow-Troisier. Na forma de disseminação peritoneal, podem ser apresentados nódulos/empastamentos de fundo de saco de Douglas no toque retal, conhecido como Sinal/Prateleira de Blumer, metástases nos ovários no exame ginecológico, o tumor de Krukenberg, e nodulação na cicatriz umbilical, o nódulo de Maria José. (FOGAÇA et al., 2003; SCHLIOMA ZATERKA; NATAN EISIG, 2016; SERGIO GUZMÁN; ENRIQUE NORERO, 2014; STRONG, 2015)

A perda de peso que ocorre nos pacientes com neoplasias gástricas não é associada a um aumento do catabolismo devido ao câncer, mas sim a uma ingestão calórica insuficiente, que pode ser atribuída a anorexia, náusea, dor abdominal, plenitude gástrica e disfagia. Além disso, os sintomas de náusea ou plenitude gástrica precoce ocorrem devido à massa do tumor; em casos de formas agressivas do câncer gástrico do tipo difuso chamado de linitis plástica, esses sintomas se devem à inabilidade de distensão gástrica. Pacientes também podem cursar com obstrução gástrica devido crescimento distal do tumor em região de piloro. Pode-se observar também a presença de sangramento gastrointestinal em formas leves como

sangramento gastrointestinal oculto com ou sem anemia ferropriva ou até formas mais graves apresentando-se como melena ou hematêmese. (MANSFIELD, 2021)

As formas de disseminação metastática do câncer gástrico são: invasão direta de estruturas adjacentes, disseminação hematogênica, linfática, transcelômica, mesogástrica e endoluminal. (VIRGILIO, 2018)

O sistema de estadiamento mais aceito de câncer gástrico hoje no mundo é o TNM, do American Committee on Cancer (AJCC), que periodicamente atualiza seus protocolos de acordo com o tamanho do tumor (estadiamento T), acometimento linfático (estadiamento N) e a presença de metástase à distância (estadiamento M), o qual se configura os quadros 1 e 2 a seguir. (SOBIN; WITTEKIND; INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER, 2002; STRONG, 2015)

QUADRO 1 - ESTADIAMENTO TNM

Tumor primário (T)		
TX	Não pode ser avaliada	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Tis	Carcinoma in situ – tumor intraepitelial sem invasão da lâmina própria;	
T1	T1a	Tumor invade a lâmina própria
	T1b	Tumor invade a mucosa
	T1c	Tumor invade a submucosa
T2	Tumor invade a camada muscular	
T3	Tumor penetra na serosa da submucosa sem invadir o peritônio visceral ou estruturas adjacentes	

T4	T4a	Tumor invade a serosa do peritônio visceral
	T4b	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos regionais acometidos (N)		
NX	Não pode ser avaliado	
N0	Sem metástase linfonodal	
N1	Metástase em 1 ou 2 linfonodos regionais	
N2	Metástase de 3 a 6 linfonodos regionais	
N3	Metástase de 7 ou mais linfonodos regionais	
Presença de metástase à distância (M):		
MX	Não pode ser avaliada	
M0	Sem metástase à distância	
M1	Com metástase à distância	

Fonte: Adaptado de Strong, 2005

QUADRO 2 - ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE ACORDO COM O TNM

ESTADIAMENTO			
Estágio 0	Tis	N0	M0
Estágio IA	T1	N1	M0
Estágio Ib	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Estágio IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Estágio IIB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estágio IIIB	T4b	N0	M0
	T4b	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Estágio IIIC	T4b	N2	M0

	T4b	N3	M0
	T4a	N3	M0
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de Strong, 2005

2.2. CARCINOMATOSE PERITONEAL

A carcinomatose peritoneal é causada pela implantação de células tumorais livres na cavidade peritoneal por exfoliação do tumor primário antes ou durante a cirurgia curativa (KIM, 2016). Até a década de 1990, a carcinomatose peritoneal advinda do câncer gástrico foi considerada uma doença terminal (YONEMURA, 2016). A carcinomatose peritoneal pode causar obstrução intestinal, além de ascite maligna massiva, resultando invariavelmente em morte (THOMASSEN, 2013).

De todos os cânceres gastrointestinais, a incidência relativa de carcinomatose peritoneal é a maior advinda de câncer gástrico que se encontra entre 15% a 43%, dependendo do subtipo (CORTÉS-GUIRAL, 2021)

Apesar de grandes avanços na seleção molecular e nos novos quimioterápicos, o efeito terapêutico ainda é pouco eficaz. A mediana da sobrevida geral de pacientes com carcinomatose peritoneal de câncer gástrico é apenas de 3 a 6 meses, sem nenhum tipo de tratamento. Uma modalidade de tratamento esperançosa é a modalidade multidisciplinar, utilizando-se de cirurgia associado a quimioterapia (WANG, 2019)

2.3. LAVADO PERITONEAL

Além de métodos radiológicos e endoscópicos, o estudo do líquido peritoneal pode ser de grande valia para a pesquisa de metástase peritoneal no adenocarcinoma gástrico, comum pelo processo de migração de células cancerígenas direto da lesão primária para o líquido peritoneal. (STRONG, 2015)

A citologia oncótica apresenta algumas limitações importantes de seu uso: até mesmo na diferenciação de células benignas de malignas. E a origem de uma célula neoplásica. E mesmo assim, é um importante preditor de prognóstico reservado; no estudo de Ribeiro et al. foi observado com 100% de recorrência após tratamento em pacientes com citologia positiva, enquanto que o tratamento com quimioterapia de pacientes com metástase por citologia positiva aumentou a chance de sobrevivência e um ganho de expectativa de vida de 7 meses. (ALVES, 2008; PERES, 2018; RIBEIRO et al., 1998; STRONG, 2015)

Um método complementar à citologia oncótica do líquido peritoneal é a imunocitoquímica, reconhecendo marcadores usados na pesquisa de carcinomas de células mesoteliais, epiteliais, malignidade/proliferação, transição epitelial/mesenquimal e marcadores de sítio primário. (PERES, 2018)

2.4. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo consiste em uma tecnologia que analisa individualmente células ou partículas suspensas em uma solução salina tampão enquanto passam por múltiplos ou um único laser, geralmente um laser de luz visível. A análise é feita baseada em dois parâmetros, o da luz visível e o da fluorescência. O laser, ao atingir as células, se espalha em duas direções principais: para frente (Front Scatter ou FSC), que indica o tamanho relativo da célula e para os lados (Side Scatter ou SSC) que indica a granularidade ou complexidade da célula. A amostra é preparada para análise de fluorescência por meio da expressão de proteínas fluorescentes, coramento com corantes fluorescentes ou por meio de conjugação com anticorpos fluorescentes. (MCKINNON, 2018)

A citometria de fluxo pode medir rápida e quantitativamente várias características celulares individuais, porém é mais utilizada para identificar antígenos celulares expressos em tumores “líquidos”, como leucemias e neoplasias mieloides. Uma vantagem da citometria de fluxo sobre a imunohistoquímica é que múltiplos antígenos podem ser verificados simultaneamente em células individuais, utilizando combinações de anticorpos específicos ligados a diferentes corantes fluorescentes. A citometria de fluxo e a imunohistoquímica auxiliam no diagnóstico e classificação de cânceres, devido a distintos padrões de expressões proteicas definindo diferentes cânceres. (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015)

O exame tem múltiplas aplicações, como imunofenotipagem, análise de proliferação e de apoptose, além de ordenação de células. (MCKINNON, 2018)

Um dos anticorpos utilizados neste estudo foi o EpCam/CD326, também conhecido como Ep-CAM, 17-1A, HEA125, MK-1, GA733-2, EGP-2, EGP34, KSA, TROP-1, ESA, e KS1/4, o qual é um marcador epitelial de membrana celular, sendo conhecido por ser um dos mais frequentes e sensíveis anticorpos monoclonais a expressar antígenos associados a uma grande variedade de adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas. EpCAM é um tipo de membrana proteica de 314 aminoácidos com dois domínios idênticos a Fatores de Crescimento Epidérmico. (BAEURLE, 2017)

Como a variabilidade de densidade celular é alta na cavidade peritoneal, usamos o anticorpo CD45 para controle interno, com contagem de outras linhagens celulares - sendo a leucocitária a mais predominante e relativamente estável. CD45, também conhecido como antígeno comum leucocitário, é uma família de proteínas transmembranas expressas em todas as células nucleadas de linhagem hematopoética. (ALTIN, 1997)

Usando a citometria de fluxo, foi calculado o número de células CD326+ e CD45- e de CD45+ e CD326-, as quais foram denominadas células tumorais e leucócitos. Esses números foram utilizados para calcular a razão células tumorais/leucócitos (*tumor cells-leukocyte ratio* - *TLR*), o qual visa expressar o número de células tumorais vivas dos líquidos obtidos nos lavados peritoneais.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. TIPO DE ESTUDO

Estudo transversal observacional agregado, caracterizando um estudo ecológico, com análise de pacientes no período de agosto de 2016 até março de 2022 por meio do registro de prontuários eletrônicos dos pacientes atendidos no Serviço de Cirurgia Geral e do Aparelho Digestivo do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) diagnosticados com adenocarcinoma e coleta de amostras e amostras previamente coletadas e processadas por Citômetro de Fluxo.

3.2. AMOSTRA E POPULAÇÃO

Amostra: Pacientes diagnosticados com adenocarcinoma atendidos no Hospital João de Barros Barreto (HUJBB) com diagnóstico de neoplasia de estômago por Endoscopia Digestiva Alta que passarão por procedimentos de gastrectomia subtotal ou total.

Critério de inclusão:

- Pacientes com Endoscopia Digestiva Alta com anatomopatológico pré-operatório da lesão confirmando adenocarcinoma gástrico
- Pacientes que passaram ou passarão pelo procedimento cirúrgico de Gastrectomia subtotal ou total devido diagnóstico de adenocarcinoma gástrico

Critério de Exclusão:

- Pacientes que se recusarem a participar da pesquisa
- Confirmação de Metástase por meio de laparoscopia
- Pacientes com ascite maligna (carcinomatose peritoneal)
- Pacientes que não podem realizar Gastrectomia
- Pacientes que realizaram gastrectomia por outros motivos além do câncer gástrico
- Pacientes com outras neoplasias concomitantes (segundo primário).

3.3. AMBIENTE DE PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Serviço de Cirurgia Geral e do Aparelho Digestivo do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) situado em Belém - PA.

3.4. COLETA DE DADOS

Foram retirados do prontuário os seguintes dados: idade, sexo, anatomopatológico de peça cirúrgica, data e tipo de cirurgia, estadiamento e estágio clínico, se houve neoadjuvância, se houve adjuvância, anatomopatológico de endoscopia e se há comorbidades e quais; os dados serão coletados a partir de prontuários eletrônicos do HUJBB que estejam em consonância com os critérios de inclusão e exclusão.

Foram analisadas 3 amostras teciduais de cada paciente em cada procedimento de Gastrectomia, 1 amostra de 20 mL no primeiro momento da cirurgia: inventário utilizando 1 litro de Soro Fisiológico para a lavagem peritoneal; 1 amostra de 20 mL no segundo momento, após a ressecção gástrica, utilizando 1 litro de Soro Fisiológico para a lavagem peritoneal e após a troca de luvas estéreis; e 1 amostra de 20 mL no terceiro momento, após a ressecção gástrica, utilizando 9 litros de Soro Fisiológico para a lavagem peritoneal.

As amostras foram preservadas em geladeira, centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos e então foram separados o sobrenadante e os resíduos nucleares e posteriormente enviadas para análise no Citômetro de Fluxo.

O anticorpo utilizado neste estudo será o EpCam/CD326, como marcador de células tumorais e CD45 como marcador de linhagem celular hematopoiética para controle.

3.5. ANÁLISE DOS DADOS

Após a coleta, foi elaborado um banco de dados, utilizando o software Microsoft Excel e realizada análise estatística pelo software Bioestat 5.0.

3.6. ASPECTOS ÉTICOS – RISCOS E BENEFÍCIOS

Riscos:

- Quebra de sigilo;
- Vazamento de dados;
- Constrangimento ao se expor durante a realização de exames.

Benefícios:

- Fornecer dados para embasar o conhecimento científico, do governo e da população em geral a fim de aprimorar e melhorar o tratamento de pacientes com adenocarcinoma gástrico;
- Fornecer embasamento para cirurgiões para a produção de protocolos de gastrectomia em pacientes com adenocarcinoma gástrico, seja promovendo ou contraindicando a lavagem peritoneal.

4. RESULTADOS

Foi usado o cálculo TLR (tumor to leukocytes ratio - razão de células tumorais para leucócitos) para análise dos resultados do citômetro, o qual se dá pela seguinte fórmula:

$$TLR = \frac{Células\ CD326(+)\ -\ Células\ mIgG(+)}{[Células\ intraperitoneais\ tumorais\ livre\ CD45(+)\ -\ Células\ intraperitoneais\ tumorais\ livres\ mIgG(+)]} * 100$$

O método de cálculo do TLR é o mais facilmente reprodutível e confiável para analisar células tumorais intraperitoneais. (KITAYAMA, 2014)

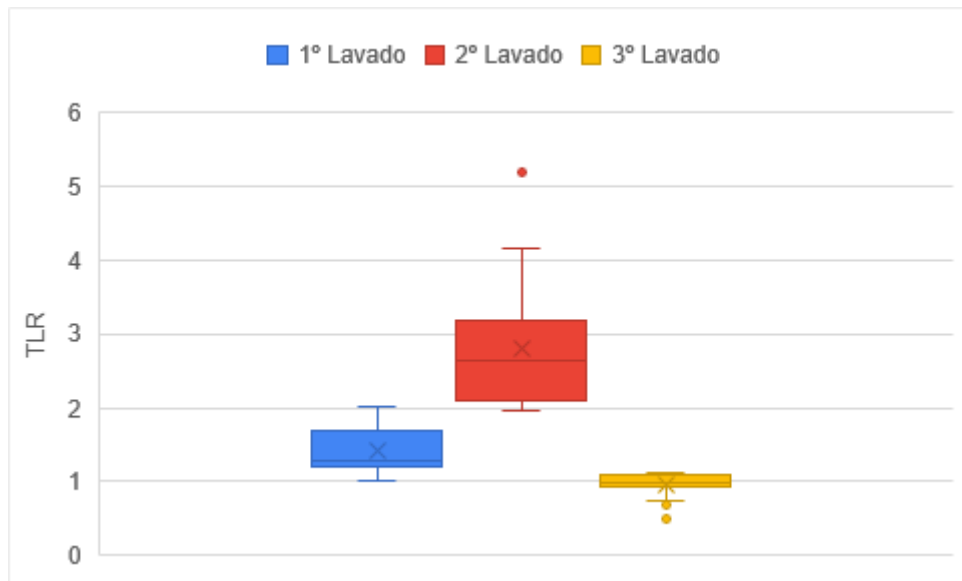
Obtivemos amostras de 34 pacientes, sendo que destes, 18 são homens (52,94%) e 16 são mulheres (47,05%), variando em faixa etária entre 32 anos a 80 anos, sendo a média das idades 58,5, a mediana 59 e a moda 63.

O valor das células marcadas nos lavados peritoneais variaram apresentando média dos primeiros lavados de 1,42 e mediana de 1,28, média dos segundos lavados de 2,80 e

mediada de 2,63 e média dos terceiros lavados de 0,96 e mediana de 0,97. A tabela com todos os resultados pode ser vista no apêndice A.

A partir da análise destes resultados, podemos construir o seguinte gráfico:

Gráfico 1: Cálculo do TLR nos diferentes momentos do lavado peritoneal.



Fonte: elaboração própria

De acordo com o gráfico, obtivemos uma maior variabilidade na quantidade de células tumorais no 2º lavado tendo ainda o seu primeiro quartil maior que o terceiro quartil do grupo de amostra que mais se aproxima dele, o de 1º lavado. O mesmo padrão se repete entre o grupo de 1º e 3º lavados. Também é exibida uma discrepância quanto à variabilidade de percentis, como se pode notar pela diferença entre as amplitudes de cada BoxPlot.

Já era esperada uma variabilidade expressiva no conjunto referente ao 2º lavado, devido ao caráter anárquico em que são coletadas as amostras, podendo ser analisados aqui as técnicas de reconstrução do trato digestivo, a mobilização de estruturas adjacentes, a técnica empregada, entre outros, assim como a baixa variabilidade do 3º ser devido ao grande volume de diluente usado para a coleta da amostra neste momento. Podemos observar que os 1º e 3º lavados são assimétricos positivos e o 2º lavado é simétrico. Isso

pode indicar que, entre os grupos assimétricos, pode ter ocorrido uma interferência na distribuição dos dados pelas medidas discrepantes. Mesmo ao se considerar esta interferência, podemos inferir uma diferença significativa entre as análises através da leitura dos extremos superior e inferior de cada bloco e descartando os outliers.

Foi utilizado o cálculo de Kruskal-Wallis para análise de variância das amostras dos 3 lavados de cada paciente, apresentando os resultados descritos nas tabelas 1 e 2.

O teste de Kruskal-Wallis é utilizado aqui para diferenciar entre as 3 amostras independentes, os valores numéricos foram transformados em postos e realizada a comparação por meio da média entre eles.

Tabela 1: Teste de Kruskal-Wallis

Resultado do teste de Kruskal-Wallis	Valor
(p) Kruskal-Wallis=	0.00
H=	82,66
R1 (posto médio)	46.98
R2 (posto médio)	84.51
R3 (posto médio)	23.00

Fonte: elaboração própria

Obtivemos, para o total do teste, um $H = 82,66$ e $p = 0.00$, ou seja, os grupos dos 3 lavados apresentaram uma diferença estatisticamente significativa. Para cada grupo analisado temos: R1 referente aos resultados do 1º lavado peritoneal com $p = 46.98$; R2 (2º lavado) com $p = 84.51$ e R3 (3º lavado) com $p = 23.00$.

De acordo com a hipótese esperada, obtivemos uma quantidade de células tumorais intermediária no 1º lavado, quando é realizado o inventário da cavidade, logo após a incisão da pele e da parede abdominal a fim de expor os órgãos a serem abordados. Neste momento, ainda não houve contaminação proveniente do tubo gástrico ou exérese dos tecidos afetados pelo câncer primário.

Foi significativamente maior no momento do 2º lavado, logo após a gastrectomia, ou seja, extensa mobilização dos órgãos e tecidos afetados e restabelecimento da continuidade do sistema digestório. As amostras foram obtidas após o uso de 1 Litro de solução salina na cavidade. Enquanto que no 3º lavado, posterior à lavagem extensiva da cavidade abdominal com 9 Litros de soro fisiológico e troca das luvas estéreis, houve a menor contagem dentre todos os tempos descritos.

Tabela 2: Teste de comparação de Student-Newman-Keuls

Comparações Student-Newman-Keuls	Dif. Postos	p-valor
Grupos (1 e 2)	37.52	<0.0001
Grupos (1 e 3)	23.98	0.0008
Grupos (2 e 3)	61.51	<0.0001

Fonte: elaboração própria

De acordo com o resultado do teste de Student-Newman-Keuls, é possível perceber que há pouca variação do TLR entre os grupos 1 e 2 e entre os grupos 1 e 3, porém, é perceptível uma grande variação entre os grupos 2 e 3. Este teste não mostra qual o sentido da variação da média, porém, é possível observar pelo gráfico que a variação entre o grupo 2 e 3 é negativa, demonstrando o resultado esperado no uso da lavagem peritoneal na redução do TLR ao longo do procedimento de gastrectomia. Todas as variações foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

Segundo os resultados exibidos acima, podemos incitar que há uma quantidade de células tumorais livres na cavidade peritoneal de pacientes liberadas pelo carcinoma antes de haver uma possível contaminação do sítio cirúrgico. Esta é uma das causas pela qual é apontado o mal prognóstico de pacientes com câncer gástrico avançado, pois nesta, a recorrência de disseminação peritoneal possui altos valores e a sua detecção é difícil especialmente em estágios prematuros, quando há maior possibilidade de controle. (YAMAMOTO 2004)

Esses estágios iniciais são devido a células tumorais livres, não sendo visíveis a olho nu ou em exames de imagem como Ultrassonografia, Tomografia computadorizada ou Ressonância Magnética, os quais são normalmente realizados no decorrer do estadiamento da doença. A ultrassonografia endoscópica foi um dos exames de imagem com maior sensibilidade em um estudo por Wang et al em 2019, com uma sensibilidade de 34%, demonstrando a baixa acurácia dos exames de imagem.

A citopatologia diagnóstica tem sido usada como diagnóstico e, mesmo com sua baixa acurácia, tem sido considerado um fator preditor independente importante na taxa de sobrevivência quando comparado a outras variáveis, como invasão da camada serosa e envolvimento linfonodal. É definido também como o mais potente fator preditor de desfecho clínico em pacientes submetidos a cirurgia curativa. (JAMEL, 2018; BANDO 1999; FUKAGAWA, 2010)

A detecção de células tumorais intraperitoneais tem sido um importante preditor no prognóstico de pacientes com câncer gástrico, porém há uma importante dificuldade em diagnosticar e conseqüentemente tratá-las. Uma forma de se analisar é a citopatologia oncológica, a qual tem uma sensibilidade muito variável (de 26% a 70,8%), a qual pode estar relacionada com a interpretação do médico patologista, do método de padronização e dos materiais utilizados. Outra alternativa é o RT-PCR em tempo real com detecção molecular de RNA mensageiro específicos de antígeno carcinoembrionário e citoqueratinas 19 e 20, porém este possui dois vieses: o uso de mRNA amplificado pode ser derivado de células mortas e os

marcadores podem ser derivados de células hematopoiéticas durante processos inflamatórios. (CARLOTTO, 2020; KITAYAMA, 2015)

A citometria de fluxo é uma alternativa para a detecção de células tumorais em meio líquido. Ela utiliza uma técnica baseada em laser óptico. O fluxo celular é laminar e as células são analisadas uma a uma, de acordo com os comprimentos de onda dos fluorocromos dos anticorpos empregados. Assim, características como mecanismo interno das partículas, tamanho, granulosidade e intensidade da fluorescência são captados e analisados pelas 5 etapas do sistema eletrônico e então executados e processador por um sistema computacional via *software*. (BRAGA, 2016). Devido ser um método baseado em contagem de células individualmente e uso de marcadores imunológicos, isso torna-o um métodos mais objetivo e confiável, em comparação com a citologia oncológica, que depende da avaliação de um patologista.

Em diversos estudos, podemos comprovar que a mudança de status de detecção positiva de células neoplásicas em citopatologia em RT-PCR e a diminuição da quantidade em Citometria de fluxo revela um prognóstico melhor. (JAMEL, 2018; KITAYAMA, 2015)

A lavagem peritoneal extensa, como descrita aqui neste estudo, é uma sugestão de tratamento e controle das células tumorais livres da cavidade peritoneal. A técnica foi descrita como uma proposta de reduzi-las em potencialmente zero, sob a “teoria de diluição limitada”, segundo a qual a diluição extensiva do líquido peritoneal com solução salina com uma movimentação da cavidade e aspiração completa do fluido levaria a uma redução logarítmica das células cancerígenas em até 1:10. (KURAMOTO et al, 2009)

Segundo o resultado em que obtivemos baixa quantidade de células tumorais no 3º Lavado podemos inferir uma forma de tratamento da disseminação peritoneal do adenocarcinoma gástrico, confirmando que a diluição do conteúdo peritoneal pós-cirúrgico reduz consideravelmente os precursores neoplásicos. A maioria das amostras utilizadas neste estudo se trata de procedimentos realizados nos anos de 2021 e 2022, assim não podemos apresentar dados sobre o desfecho clínico a longo prazo.

6. CONCLUSÃO

Em posse desses resultados e do confronto com o referencial teórico pesquisado, foi possível observar que o lavado peritoneal gera uma redução estatisticamente significativa na quantidade de células tumorais. Porém, ainda há necessidade de estudos prospectivos para acompanhamento dos pacientes submetidos a esse procedimento, podendo demonstrar se há aumento da sobrevida livre de doença com o uso dessa técnica, comparando os resultados com um grupo de controle.

REFERÊNCIAS

- ALTIN, Joseph G; SLOAN, Erica K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. **Immunology And Cell Biology**, [S.L.], v. 75, n. 5, p. 430-445, out. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.1997.68>.
- ARAÚJO, N. C. DE; SOUZA, B. B. DE; YAMANAKA, A. Câncer Gástrico Avançado: Acurácia da Biópsia Endoscópica. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 3, p. 299–305, 17 dez. 2013.
- BAEUERLE, P; GIRES, O. EpCAM (CD326) finding its role in cancer. **British Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 96, n. 3, p. 417-423, 9 jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603494>
- BALFOUR, D. C. FACTORS OF SIGNIFICANCE IN THE PROGNOSIS OF CANCER OF THE STOMACH: **Annals of Surgery**, v. 105, n. 5, p. 733–740, maio 1937.
- BANDO, Etsuro; YONEMURA, Yutaka; TANIGUCHI, Keizo; YASUI, Toshiaki; FUSHIDA, Sachio; FUJIMURA, Takashi; NISHIMURA, Gen-Ichi; MIWA, Koichi. Intraoperative lavage for cytological examination in 1,297 patients with gastric carcinoma. **The American Journal Of Surgery**, [S.L.], v. 178, n. 3, p. 256-262, set. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9610\(99\)00162-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9610(99)00162-2).
- BRASIL. Ministério da Saúde.
- CARLOTTO, Jorge Roberto Marcante; CARLOTTO, Fernanda Marcante; VESCO NETO, Marcos dal; PASTORELLO, Julia; SCHMITZ, Lucas Duda; DAL-VESCO, Juarez Antonio. Laparoscopia e lavado peritoneal no pré-operatório do adenocarcinoma gástrico: podemos modificar a conduta?. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, [S.L.], v. 46, n. 6, p. 1-6, 2019. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0100-6991e-20192314>.
- CORTÉS-GUIRAL, Delia; HÜBNER, Martin; ALYAMI, Mohammad; BHATT, Aditi; CEELLEN, Wim; GLEHEN, Olivier; LORDICK, Florian; RAMSAY, Robert; SGARBURA, Olivia; SPEETEN, Kurt van Der. Primary and metastatic peritoneal surface malignancies.

Nature Reviews Disease Primers, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-23, dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-021-00326-6>.

EMOTO, Shigenobu; KITAYAMA, Joji; ISHIGAMI, Hironori; YAMAGUCHI, Hironori; WATANABE, Toshiaki. Clinical Significance of Cytological Status of Peritoneal Lavage Fluid During Intraperitoneal Chemotherapy for Gastric Cancer with Overt Peritoneal Dissemination. **Annals Of Surgical Oncology**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 780-786, 13 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-014-4082-y>.

FOGAÇA, H. S. et al. Nódulo umbilical metastático (nódulo da Irmã Maria José): um sinal de alerta para tumoração maligna intra-abdominal - relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 6, p. 449–452, jul. 2003.

FUKAGAWA, Takeo; KATAI, Hitoshi; SAKA, Makoto; MORITA, Shinji; SASAJIMA, Yuko; TANIGUCHI, Hirokazu; SANO, Takeshi; SASAKO, Mitsuru. Significance of Lavage Cytology in Advanced Gastric Cancer Patients. **World Journal Of Surgery**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 563-568, 7 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00268-009-0355-1>.

GONÇALVES, F. S. et al. Perfil clínico epidemiológico do câncer gástrico: revisão integrativa. **Pubsaúde**, v. 3, p. 1–10, 2020.

GUO, J. et al. Combined Surgery and Extensive Intraoperative Peritoneal Lavage vs Surgery Alone for Treatment of Locally Advanced Gastric Cancer: The SEIPLUS Randomized Clinical Trial. **JAMA Surgery**, v. 154, n. 7, p. 610, 1 jul. 2019.

JAGRIC, T. et al. Flow cytometry as the new ‘gold standard’ for detection of free tumour cells in abdominal lavage fluid in gastric cancer patients: A comparative study of molecular and conventional methods: A comparative study of tumour cell detection with flow cytometry, RT-qPCR and cytology. **Surgical Practice**, v. 20, n. 2, p. 73–81, maio 2016.

JAMEL, Sara; MARKAR, Sheraz R.; MALIETZIS, George; ACHARYA, Amish; ATHANASIOU, Thanos; HANNA, George B.. Prognostic significance of peritoneal lavage

cytology in staging gastric cancer: systematic review and meta-analysis. **Gastric Cancer**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 10-18, 4 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10120-017-0749-y>.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul; ASTER, Jon. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015

KUMAR, V. **Robbins Patologia Basica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2013.

KURAMOTO, M. et al. Extensive Intraoperative Peritoneal Lavage as a Standard Prophylactic Strategy for Peritoneal Recurrence in Patients with Gastric Carcinoma. **Annals of Surgery**, v. 250, n. 2, p. 242–246, ago. 2009.

MANSFIELD, Paul R. Clinical features, diagnosis, and staging of gastric cancer. UpToDate. Disponível em < <https://www.uptodate.com/contents/search> >. Acesso em: 30/07/2021

MCKINNON, Katherine M.. Flow Cytometry: an overview. **Current Protocols In Immunology**, [S.L.], v. 120, n. 1, p. 1-16, jan. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cpim.40>.

NEVES, V. H. D. et al. Epidemiologia e fatores de risco associados às neoplasias gástricas: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Científico**, v. 21, p. e6421–e6421, 25 fev. 2021.

SCHLIOMA ZATERKA; NATAN EISIG. **Tratado de gastroenterologia**. 2. ed. São Paulo: ATHENEU, 2016.

SERGIO GUZMÁN, B.; ENRIQUE NORERO, M. Cáncer gástrico. **Revista Médica Clínica Las Condes**, Tema central: Salud del hombre. v. 25, n. 1, p. 106–113, 1 jan. 2014.

SITARZ, Robert; SKIERUCHA, Małgorzata; MIELKO, Jerzy; OFFERHAUS, Johan; MACIEJEWSKI, Ryszard; POLKOWSKI, Wojciech. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. **Cancer Management And Research**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 239-248, fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/cmar.s149619>.

- SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C.; INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (EDS.). **TNM: classification of malignant tumours**. 6th ed ed. New York: Wiley-Liss, 2002.
- STRONG, V. E. (ED.). **Gastric Cancer**. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- THOMASSEN, Irene; VAN GESTEL, Yvette R.; VAN RAMSHORST, Bert; LUYER, Misha D.; BOSSCHA, Koop; NIENHUIJS, Simon W.; LEMMENS, Valery E.; HINGH, Ignace H. de. Peritoneal carcinomatosis of gastric origin: a population-based study on incidence, survival and risk factors. **International Journal Of Cancer**, [S.L.], v. 134, n. 3, p. 622-628, 20 nov. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28373>.
- TOWNSEND, Courtney; BEAUCHAMP, Daniel; EVERS, Mark; MATTOX, Kenneth. **Sabiston Tratado de Cirurgia: a base biológica da prática cirúrgica moderna**. 19. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- WANG, Zhen; CHEN, Jun-Qiang; LIU, Jin-Lu; TIAN, Lei. Issues on peritoneal metastasis of gastric cancer: an update. **World Journal Of Surgical Oncology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-8, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12957-019-1761-y>.
- YAMAMOTO, Manabu; BABA, Hideo; KAKEJI, Yoshihiro; ENDO, Kazuya; IKEDA, Yasuharu; TOH, Yasushi; KOHNOE, Shunji; OKAMURA, Takeshi; MAEHARA, Yoshihiko. Prognostic Significance of Tumor Markers in Peritoneal Lavage in Advanced Gastric Cancer. **Oncology**, [S.L.], v. 67, n. 1, p. 19-26, 2004. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000080281>.
- YONEMURA, Yutaka; ISHIBASHI, Haruaki; HIRANO, Masamitsu; MIZUMOTO, Akiyoshi; TAKESHITA, Kazuyosi; NOGUCHI, Kousuke; TAKAO, Nobuyuki; ICHINOSE, Masumi; LIU, Yang; LI, Yan. Effects of Neoadjuvant Laparoscopic Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy and Neoadjuvant Intraperitoneal/Systemic Chemotherapy on Peritoneal Metastases from Gastric Cancer. **Annals Of Surgical Oncology**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 478-485, 9 ago. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1245/s10434-016-5487-6>.

APÊNDICE A

Tabela de resultados da citometria de fluxo

PACIENTES	LAVADO 1	LAVADO 2	LAVADO 3
1	1,21	2,70	1,08
2	1,60	2,95	1,06
3	1,21	2,49	1,08
4	1,21	2,13	1,08
5	1,21	2,17	1,08
6	1,20	2,05	0,95
7	1,21	3,49	0,98
8	1,87	3,10	0,96
9	1,90	3,89	0,94
10	1,74	2,98	0,95
11	1,20	2,98	0,98
12	1,21	2,58	0,97
13	1,02	2,45	0,92
14	1,61	3,17	0,93
15	1,21	2,06	0,91
16	1,21	2,02	0,98
17	2,01	5,18	0,97
18	1,61	4,16	0,93
19	1,79	3,80	1,11
20	1,97	3,94	0,94
21	1,68	3,15	1,11

Tabela de resultados da citometria de fluxo (continuação)

22	1,28	2,10	0,98
23	1,28	2,11	0,98
24	1,28	2,07	0,93
25	1,28	3,91	0,98
26	1,28	2,14	1,11
27	1,28	2,09	1,07
28	1,28	2,11	1,09
29	1,78	2,37	0,94
30	1,22	2,20	0,88
31	1,82	3,10	1,11
32	1,42	3,17	0,73
33	1,12	2,71	0,70
34	1,29	1,96	0,50

Fonte: elaboração própria

APÊNDICE B



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA**

TCLE – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, numa pesquisa científica sobre câncer gástrico. Ao concordar em participar você deve assinar duas vias desse documento, uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores.

O presente projeto intitulado: **“ANÁLISE DE LAVADOS PERITONEAIS DE PACIENTES COM ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EM TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO”**, investiga a relação entre o uso da técnica de lavados peritoneais e o prognóstico dos pacientes e está sendo desenvolvido pela discente Cammyla Souza de Sá Rocha, de número de matrícula 201609740081, CPF 021.048.912-05, acadêmica do décimo semestre do Curso de Medicina da Universidade Federal do Pará e pelo discente Nilson Shinichi Yoshino, de número de matrícula 201609740138, CPF 035.922.062-22, acadêmico do décimo semestre do curso de medicina da Universidade Federal do Pará e orientados pelo Dr. Geraldo Ishak, CRM PA 4527, Médico e Professor de Cirurgia da Universidade Federal do Pará.

O objetivo do estudo é avaliar se há diminuição de células malignas no lavado peritoneal durante a cirurgia com o intuito de estabelecer uma correlação entre o uso de

lavados peritoneais e redução do número total de células do câncer livres na cavidade abdominal, reduzindo assim o risco de metástases, principalmente para o fígado e peritônio (carcinomatose peritoneal), melhorando assim o possível prognóstico e sobrevida livre de doença do paciente.

Informamos que a investigação se trata apenas de coletar os dados clínicos do(a) paciente, sem ter qualquer influência sobre o processo de consulta médica e de tratamento, não existindo qualquer risco para os envolvidos, cuja participação se resume na coleta de dados em prontuários eletrônicos que serão analisadas com total imparcialidade e que serão mantidos em total sigilo, preservando a identidade da pessoa e coleta de materiais durante a cirurgia que serão posteriormente levados ao Hospital Ophir Loyola para serem analisados por um citômetro de fluxo.

As consultas médicas são realizadas de rotina pela equipe do serviço de cirurgia geral e da oncologia do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB), no ambulatório de cirurgia geral e na UNACON, respectivamente. O período do estudo será do mês de setembro de 2021 a março de 2022, e os dados pessoais não serão revelados em hipótese alguma.

Para tanto, é de praxe que seja solicitada a sua autorização, para que os dados registrados em prontuário da consulta (sintomas, exames e cirurgias) possam ser avaliados em conjunto com o de outros pacientes, e – se for o caso – publicados em congressos, simpósios, jornadas e eventos da área de saúde, sempre garantindo que seu nome ou dados de identificação serão mantidas no mais absoluto sigilo, sem que seja possível que terceiros lhe identifiquem a partir desse estudo.

Reiteramos que sua participação é voluntária e não remunerada, logo, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a colaborar com a investigação. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não terá nenhuma mudança no seu tratamento, e os pesquisadores estarão sempre disponíveis para qualquer esclarecimento que considere necessário, em qualquer etapa da pesquisa.

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável - Dr. Geraldo Ishak

Médico Cirurgião – RQE 2961 / CRM PA 4527

Declaro que li as informações acima sobre o projeto de pesquisa “**Análise de lavados peritoneais de pacientes com adenocarcinoma gástrico em técnica de citometria de fluxo**”, e que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo do mesmo, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de dados e informações sobre minha pessoa que constarão em um prontuário eletrônico, além das amostras de lavado peritoneal, as quais só poderão ser utilizadas em relatórios e publicações científicas.

Belém, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do participante

Contato com os Pesquisadores:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o orientador Dr. Geraldo Ishak, Telefone:(91) 9981-6668 / E-mail: ishakgeraldo@gmail.com; para a pesquisadora Cammyla Souza de Sá Rocha, Graduanda de Medicina da UFPA. Telefone: (94) 99300-0008 / E-mail: Cammyla.rocha@ufpa.br e para o pesquisador Nilson Shinichi Yoshino, graduando de medicina da UFPA. Telefone: (91) 98842-4138 / E-mail: nilson.yoshino@gmail.com.

Informações sobre o CEP:

Comitê de Ética do Núcleo de Pesquisa em Oncologia. Endereço: Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), na Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON), no Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO), 2o andar. Bairro: Rua dos Mundurucus, Belém-PA. CEP: 66073-005. Telefone: (91) 98107-0858. E-mail: cep.npo@gmail.com