



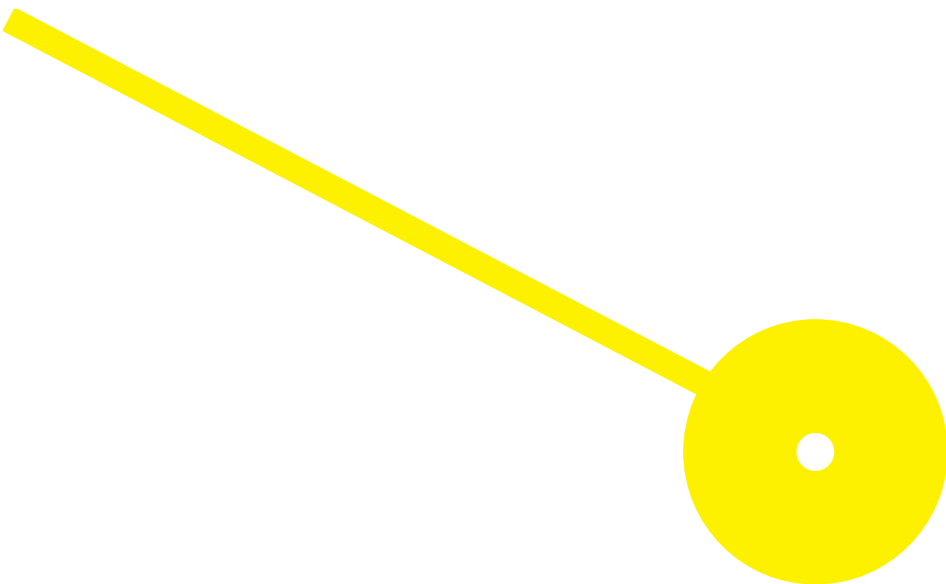
MESTRADO

Mestrado em Técnicas Laboratoriais em Biopatologia - Histopatologia

# Técnica de dissecação ganglionar em amostras cirúrgicas de cancro colorretal: revisão da literatura

Cátia Vinagre Alexandre

07/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**

**Técnica de disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de cancro colorretal: revisão da  
literatura**

**Autor**

Cátia Vinagre Alexandre

**Orientadores**

Prof Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, Escola Superior de Saúde do Instituto  
Politécnico do Porto

Dr.<sup>a</sup> Mónica Andreia Curado Conceição, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da  
Universidade do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas Laboratoriais  
em Biopatologia – Ramo de Histopatologia pela Escola Superior de  
Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

*“A nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo para vencer é tentar mais uma vez” – Thomas Edison*

Foi um caminho tortuoso até chegar aqui, mas não teria conseguido nada disto sozinha.

Quero agradecer à Técnica Mónica Curado por ter sido a responsável pela motivação, por me ter feito acreditar neste trabalho, sem isso não teria conquistado o que conquistei com ele. Também agradecer à Prof. Doutora Regina Silva e à Dra. Susana Silva pela paciência e pela dedicação nas correções e nas sugestões, por me ajudarem a tornar esta a melhor versão possível deste trabalho.

Família, a vocês, um obrigada nunca será suficiente por todo o apoio, pelo carinho e por estarem lá para mim, por confiarem e acreditarem em mim mais do que eu própria e por nunca me deixarem desistir. Ao meu avô, a verdadeira razão de eu ter chegado onde estou hoje, obrigada por iluminar o meu caminho, onde quer que esteja, espero que esteja orgulhoso de mim.

E por último, mas não menos importante, agradecer a mim mesma, foi difícil, mas consegui, e aqui está a prova disso.

## **Resumo**

A identificação de metástases ganglionares em peças cirúrgicas de cancro colorretal (CCR) é crucial para o sistema de estadiamento TNM, tendo valor prognóstico. Apesar de ser recomendado isolar um número mínimo de 12 gânglios linfáticos (GL) durante o exame macroscópico, tal nem sempre é conseguido. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os métodos de disseção ganglionar descritos na literatura, para identificar o mais eficaz no isolamento de GL em peças cirúrgicas de CCR e o seu impacto no estadiamento. Dos 41 artigos analisados foram identificados dois métodos para otimização da disseção ganglionar. O primeiro baseia-se na utilização de soluções reveladoras de GL que contribuem para o isolamento de GL de menores dimensões, dado que alguns estudos mostram que um maior número de GL pode aumentar a precisão do estadiamento e contribuir para uma decisão terapêutica mais adequada. O segundo método foca-se na disseção ganglionar seletiva de acordo com a distância dos GL à região tumoral, pois o número de GL metastizados tende a diminuir com o aumento da distância ao tumor, podendo não haver vantagem na análise total não dirigida dos GL. Embora os resultados destes métodos sejam promissores, são necessários mais estudos multicêntricos para a sua validação.

**Palavras-chave:** cancro colorretal, gânglios linfáticos, métodos de disseção ganglionar, estadiamento.

## **Abstract**

The identification of lymph node (LN) metastases in surgical specimens of colorectal cancer (CRC) is crucial for TNM staging, having high prognostic value. Although it is recommended to isolate a minimum number of 12 LNs during macroscopic examination, this is not always achieved. The aim of this study was to evaluate the LN dissection methods described in the literature, to identify the most effective method for isolating LNs in CRC surgical specimens and its impact on staging. Of the 41 articles analyzed, two methods for optimizing LN dissection were identified. The first is based on the use of LN revealing solutions that contribute to the identification of smaller LNs, given that some studies show that a higher number of LNs can increase the accuracy of the staging and contribute to a more appropriate therapeutic decision. The second method focuses on selective LN dissection according to the distance of the LNs to the tumor, and that there may be no advantage in the total arbitrary analysis of the LNs. Although the results of these methods are promising, more multicenter studies are needed for validation.

**Keywords:** colorectal cancer, lymph nodes, lymph node dissection methods, staging

## Índice

1.	Introdução .....	1
2.	Objetivos .....	3
3.	Métodos .....	4
4.	Resultados .....	5
4.1.	Cancro colorretal: estadiamento.....	6
4.2.	Disseção ganglionar .....	9
4.2.1.	Otimização da técnica de disseção ganglionar .....	10
4.2.1.1.	Soluções reveladoras de gânglios linfáticos.....	11
4.2.1.1.1.	Soluções de GEWF e RE-GEWF .....	13
4.2.1.1.2.	Soluções enzimáticas – método de dissociação.....	14
4.2.1.1.3.	Solução de Carnoy .....	16
4.2.1.1.4.	Soluções de <i>fat clearance</i> .....	17
4.2.1.1.5.	Solução de azul de metileno.....	19
4.2.2.	Comparação das soluções reveladoras de gânglios linfáticos.....	21
4.2.3.	Disseção ganglionar seletiva de acordo com a distância dos gânglios linfáticos ao tumor.....	23
5.	Discussão/Conclusão .....	26
6.	Referências Bibliográficas.....	30

## **Lista de abreviaturas e siglas**

AJCC – American Joint Committee on Cancer

CAP – College of American Pathologists

CCR – Cancro colorretal

cTNM – Sistema de estadiamento TNM clínico

D – Distância ao tumor primário

FT – Solução aquosa de formaldeído tamponado a 4%

GEWF – *Glacid acetic acid, absolute ethanol, distilled water and formaldehyde 40%*

GL – Gânglios linfáticos

HE – Hematoxilina e eosina

IHQ – Imunohistoquímica

RE-GEWF – *Recycle, eosin, glacid acetic acid, absolute ethanol, distilled water e formaldehyde 40%*

pTNM – Sistema de estadiamento TNM patológico

TNM – *Tumor, node and metastasis*

UICC – Union for International Cancer Control

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 – Critérios de classificação da estadiamento N em cancro colorretal (14).....	7
Tabela 2 – Relação entre o estadio e o sistema de estadiamento TNM em cancro colorretal (14).....	8
Tabela 3 – Soluções reveladoras de gânglios linfáticos utilizadas para a disseção ganglionar em amostras de cancro colorretal.....	12
Tabela 4 – Comparação dos resultados das diferentes soluções reveladoras com a técnica de disseção ganglionar convencional.....	21
Tabela 5 – Distribuição dos gânglios linfáticos isolados em relação à distância ao tumor, em cada um dos estudos.....	24

## Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo do processo de seleção dos artigos para leitura e redação do presente estudo.....	5
Figura 2 – A: Esquema representativo do estadiamento T do sistema TNM em cancro colorretal; B: Esquema representativo da localização dos gânglios linfáticos, agrupados por cores, ao longo do cólon e do reto. Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual 8th Edition (14).....	7
Figura 3 – Tipos de ressecções cirúrgicas de cancro colorretal. A até C: íleo-colectomia; A/B até F: hemicolectomia direita; G até I: hemicolectomia esquerda; J e K: sigmoidectomia; A/B até J: colectomia subtotal; A/B até K: colectomia total; A/B até L: proctocolectomia. Adaptado de Histopathology Specimens (5).....	9
Figura 4 – Aspeto dos gânglios linfáticos (setas vermelhas) após o tratamento com as diferentes soluções reveladoras. A: GEWF (22); B: RE-GEWF (17); C: Métodos de dissociação (12); D: Solução de Carnoy (27); E: Método de fat clearance (30); F: Solução de azul de metileno(42).....	12
Figura 5 – Esquema representativo dos métodos utilizados por Fujino et al. A: Método utilizado no estudo de 2014 (12); B: Método utilizado no estudo de 2020 (19).....	15
Figura 6 – Esquemas representativos da divisão do tecido mesocólico durante a disseção ganglionar, de acordo com cada metodologia. A: Ueno et al (43); B: Cserni et al (44); C: M. Pusztaszeri et al (16).....	24

## 1. Introdução

O cancro colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais frequentes em todo mundo, tendo sido a terceira neoplasia com maior incidência e a segunda com maior taxa de mortalidade em Portugal, segundo dados de 2020 (1).

Os fatores de risco associados ao CCR incluem o consumo de alimentos processados e de álcool, assim como o excesso de gordura corporal, principalmente abdominal (2). A predisposição genética é também um fator de risco importante nestas neoplasias, uma vez que o risco aumenta em pacientes com síndromes genéticas, como a síndrome de Lynch ou a polipose adenomatosa familiar (3).

O CCR desenvolve-se de forma insidiosa, o que leva a que não seja detetado em fases precoces da doença (2). Com a implementação de métodos de rastreio na população, como uma ferramenta de rotina, levou a um aumento do número de lesões neoplásicas detetadas em pacientes assintomáticos (3).

Em Portugal, o rastreio do CCR realiza-se através de um teste primário para pesquisa de sangue oculto nas fezes, em população assintomática entre os 50 e os 74 anos e sem outros fatores de risco associados (4). Nesta estratégia, doentes com o teste positivo para a pesquisa de sangue oculto nas fezes, é proposta a realização de colonoscopia. Aquando da realização da colonoscopia, é realizada uma observação minuciosa da mucosa e a realização de biópsias nas áreas suspeitas para efetuar um exame anatomopatológico, de forma a confirmar microscopicamente a presença/ausência de lesão (4). A colonoscopia pode estar associada também a exames radiológicos, como a tomografia computadorizada, nos casos em que são detetadas massas tumorais (5). A combinação entre o rastreio endoscópico e o conhecimento de que a maioria dos CCR surgem através dos adenomas constitui uma oportunidade para a prevenção do CCR (2).

O adenocarcinoma colorretal é a neoplasia mais comum do trato gastrointestinal, distribuindo-se topograficamente de forma equitativa (2). A localização das lesões do CCR e o seu padrão de crescimento macroscópico exibem influência na sua apresentação clínica. Os indicadores de prognóstico mais importantes são a extensão do tumor, o envolvimento das margens cirúrgicas e/ou da serosa e perfuração da parede pelo tumor (2).

A extensão da ressecção cirúrgica depende essencialmente do tipo de lesão presente. Em cirurgias com intenção curativa, é realizada uma ressecção mesentérica mais alargada com remoção dos GL regionais. No entanto, devido a dificuldades cirúrgicas, mesmo em cirurgias com intenção curativa, por vezes a ressecção mesentérica é restritiva, facto que leva a um menor número de GL isolados. Existem diversos tipos de ressecções cirúrgicas dependendo da localização das lesões presentes (5).

O exame anatomopatológico das ressecções cirúrgicas do CCR apresenta um papel determinante no prognóstico do paciente, assim como na seleção do tratamento adjuvante mais adequado (6). Uma abordagem sistemática e concisa das características do tumor no exame macroscópico destas amostras

cirúrgicas, é fundamental para garantir que todas as informações necessárias para o diagnóstico do paciente se encontram no relatório final, sendo também importante referir sempre a distância às margens cirúrgicas e a profundidade de invasão (6).

O exame macroscópico inclui a pesquisa e isolamento de GL no tecido adiposo mesocólico/mesorreto. A estimativa do número de GL isolados neste tipo de amostras cirúrgicas desempenha um papel crucial no estadiamento destes doentes, sendo importante para a determinação do melhor plano de tratamento para o doente, uma vez que as estratégias terapêuticas variam entre os grupos de pacientes com GL metastizados e doentes sem presença de GL metastizados (6,7). Em pacientes com estadio II com GL negativos, um número de GL isolados inferior ao recomendado constitui um fator de risco e pode ser um fator decisivo para o início de tratamentos adjuvantes (8).

O sistema de estadiamento mais utilizado em CCR é o Tumor, GL e Metástase (TNM) (do inglês, *Tumor, Node e Metastasis*) (9). O estadiamento N é um marcador de prognóstico com elevada significância, uma vez que, a presença de metástases nos GL regionais reduz a taxa de sobrevivência a 5 anos de 90% para 70% (8).

A avaliação do número mínimo recomendado de GL é essencial para assegurar a qualidade da disseção ganglionar, o que nem sempre é possível (10–12). Por isso, apesar de alguns autores defenderem que uma linfadenectomia regional deverá incluir, idealmente, 12 ou mais GL, esse número nem sempre é atingido na prática.

A identificação de métodos que permitam otimizar a disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de CCR é essencial, de forma a potenciar a qualidade da técnica convencional, garantindo que esta permite isolar GL de menores dimensões e que o número mínimo recomendado é atingido, mas evitando o atraso na emissão do relatório anatomopatológico (6,7,13).

## **2. Objetivos**

O presente trabalho tem como objetivos pesquisar os diferentes métodos de disseção ganglionar descritos na literatura, de forma a identificar qual o método mais eficaz no isolamento de GL nas peças cirúrgicas de CCR. Pretende-se avaliar, ainda, se estes métodos contribuem para o aumento do número de GL dissecados, nomeadamente de GL metastizados, e avaliar o seu impacto no estadiamento dos pacientes e consequente decisão terapêutica, assim como no processo laboratorial e a sua implicância no tempo para obtenção do diagnóstico.

### 3. Métodos

Esta revisão bibliográfica foi realizada, tendo por base a metodologia PRISMA, a partir de artigos presentes nas bases de dados *PubMed*, *B-On* e *Google Scholar*. Para essa pesquisa foram usadas palavras-chave como *lymph node*, *colon cancer*, *lymph node yield*, *rectal cancer*, *revealing solutions* e *distance from tumor* (14). Na pesquisa foram usados os seguintes critérios de inclusão: estudos observacionais ou experimentais usando amostras de CCR. Os critérios de exclusão foram estudos realizados noutras topografias ou em animais.

Numa primeira fase de seleção, foi realizada a leitura do título e do resumo de todos os artigos encontrados. Os artigos que mostraram cumprir os critérios de inclusão e que se encontravam dentro do tema de pesquisa foram submetidos a uma leitura integral do seu conteúdo para posterior análise e redação deste trabalho.

#### 4. Resultados

O número total de artigos encontrados nas 3 bases de dados utilizadas para a pesquisa foram de 167 (Figura 1). Destes, foram excluídos 29 por duplicação nas bases de dados e 49 por não fornecerem informações úteis para o tema em estudo, tendo apenas 42 artigos cumprido os critérios de inclusão para a redação deste trabalho (Figura 1).

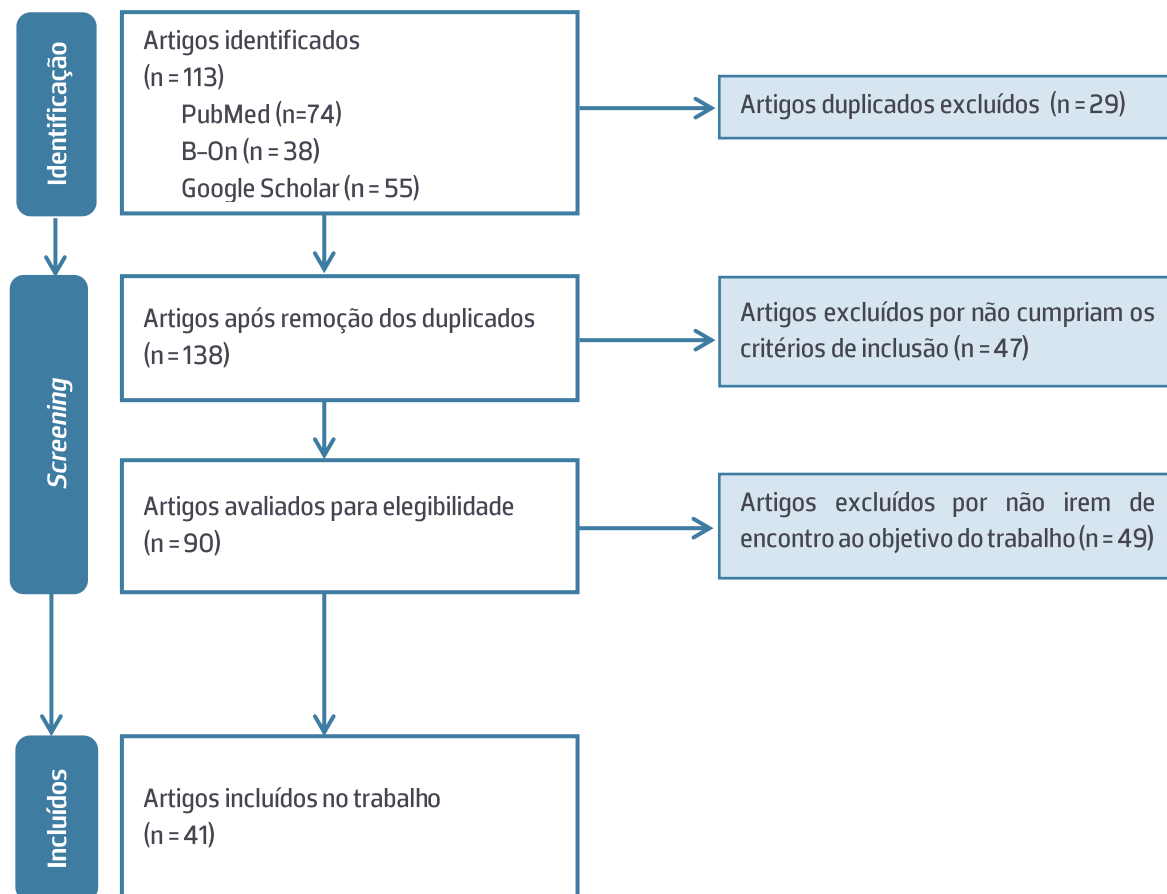


Figura 1 - Esquema representativo do processo de seleção dos artigos para leitura e redação do presente estudo, baseado na metodologia PRISMA (14).

#### 4.1. Cancro colorretal: estadiamento

O estadiamento do cancro no momento do diagnóstico anatomopatológico é um fator chave para definir o prognóstico e é uma ferramenta fundamental para determinar o tratamento adequado para os pacientes. Existem diversos sistemas de estadiamento, sendo o mais utilizado na prática clínica o sistema TNM desenvolvido pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) em colaboração com a *Union for International Cancer Control* (UICC). Este sistema de estadiamento classifica os tumores segundo o tamanho e/ou a profundidade de invasão do tumor primário (T), o envolvimento dos GL regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (9).

O sistema de estadiamento TNM pode ser subdividido em diversas classificações, de acordo com o momento de avaliação do paciente. Entre estas classificações, as predominantes são a clínica (cTNM) e a patológica (pTNM). O sistema de estadiamento pTNM é baseado no sistema cTNM que é complementado com a informação obtida após a avaliação anatomopatológica das amostras cirúrgicas (9). O sistema de estadiamento mais utilizado na avaliação de CCR é o pTNM.

O estadiamento pT no CCR tem por base a profundidade de invasão do tumor, sendo dividido em Tis, quando existe apenas invasão da lâmina própria, T1 quando existe o envolvimento da submucosa, T2 quando ocorre invasão através da submucosa mas não da muscular própria, e T3 quando há invasão através da muscular própria (Figura 2A) (15).

O estadiamento pN é relativo ao envolvimento dos GL por metástases identificadas microscopicamente. Os GL estão geralmente localizados ao longo do percurso dos vasos sanguíneos que irrigam o cólon e o reto, ao longo do sistema vascular das arcadas da artéria marginal e adjacentes ao cólon, isto é, ao longo do tecido mesocólico do cólon (Figura 2B) (15). Os GL são classificados como pN0 quando histologicamente todos os GL isolados são negativos, também o estadiamento pN1 e pN2 são atribuídos quando são isolados 1 a 3 GL positivos e 4 ou mais GL positivos, respetivamente (Tabela 1) (15).

Para a disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de CCR, a AJCC recomenda que sejam isolados no mínimo 12 GL em cirurgias curativas (15). No caso de pacientes que receberam terapia neoadjuvante, a AJCC admite que poderão estar presentes um número inferior de GL na amostra (15).

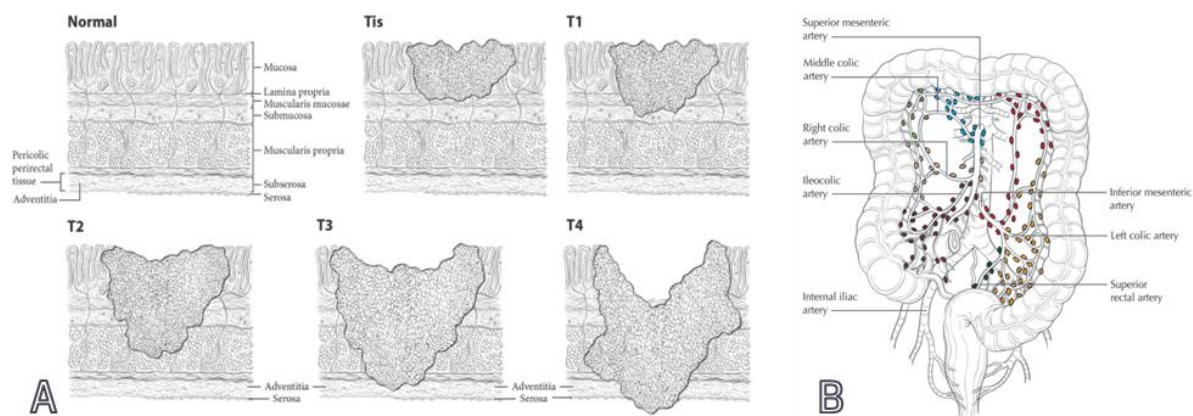


Figura 2 – A: Esquema representativo do estadiamento T do sistema TNM em cancro colorretal; B: Esquema representativo da localização dos gânglios linfáticos, agrupados por cores, ao longo do cólon e do reto. Adaptado de AJCC *Cancer Staging Manual 8th Edition* (15).

Tabela 1 – Critérios de classificação da estadiamento N em cancro colorretal (15).

Categoria N	Critério
<b>NX</b>	GL regionais não identificados
<b>N0</b>	Sem evidência de metástases nos GL
<b>N1</b>	1 a 3 GL regionais são positivos (tumor presente nos GL mede $\geq 0,2\text{mm}$ ) ou qualquer número de depósitos de tumor estão presentes e todos os GL são positivos
<b>N1a</b>	1 GL regional é positivo
<b>N1b</b>	2 ou 3 GL regionais são positivos
<b>N1c</b>	Nenhum GL regional é positivo, mas existem depósitos tumorais na subserosa, no mesentério ou em tecidos pericólicos ou perirretais/mesorretais não peritonizados
<b>N2</b>	4 ou mais GL regionais são positivos
<b>N2a</b>	4 a 6 GL regionais são positivos
<b>N2b</b>	7 ou mais GL regionais são positivos

GL – gânglios linfáticos.

O estadiamento M, é classificado através da presença ou ausência de metástases, onde M0 corresponde à não deteção de metástases à distância e M1 quando são identificadas metástases à distância num ou mais órgãos ou metástases peritoneais; de referir que a categoria M1 não é determinada pelo sistema de estadiamento pTNM, (15).

Os diferentes estadios, são grupos prognósticos, baseando-se na combinação dos estadiamentos T, N e M e em fatores de prognóstico relevantes para os pacientes (Tabela 2). O seu objetivo é definir grupos de estadios que sejam reproduzíveis e facilmente comunicados, sendo denominados com numeração romana de I até IV. O estadio 0 é utilizado para descrever neoplasias *in situ* sem risco de metastização. O estadio I é caracterizado por tumores pequenos sem invasão tumoral dos GL, os estadios II e III são caracterizados por neoplasias maiores em que o há propagação do tumor para os GL, sem afetar outras topografias e o estadio IV, o mais avançado da doença, que é caracterizado pela propagação do tumor para outras topografias mais distantes do tumor primário (9).

Tabela 2 – Relação entre o estadio e o sistema de estadiamento TNM em cancro colorretal (15).

		Sistema TNM		
		T	N	M
Estadio	0	Tis	N0	M0
	I	T1, T2	N0	M0
	II	T3, T4a, T4b	N0	M0
	III	Qualquer T	N1, N2	M0
	IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

T – tumor; N – gânglios linfáticos; M – metástases

O isolamento dos GL desempenha então um papel crucial no sistema de estadiamento pTNM e, conseqüentemente, no prognóstico dos pacientes, sendo necessário garantir a qualidade e eficiência da técnica de disseção ganglionar (16).

## 4.2. Disseção ganglionar

O objetivo da realização das ressecções cirúrgicas em pacientes com CCR é remover o tumor deixando as margens livres de lesão, incluindo o tecido adiposo circundante onde se encontram os vasos e gânglios linfáticos, prevenindo a propagação do tumor (17).

O número de GL isolados depende de diversos fatores, nomeadamente, dos inerentes ao paciente (género, idade e índice de massa corporal) sendo o mais importante o tratamento com terapia neoadjuvante, das características do tumor (localização, grau, tamanho e estadiamento) e tipo de cirurgia (Figura 3). Além destes, tem também impacto a experiência do patologista ou técnico que realiza a disseção ganglionar no momento do exame macroscópico (18,19).

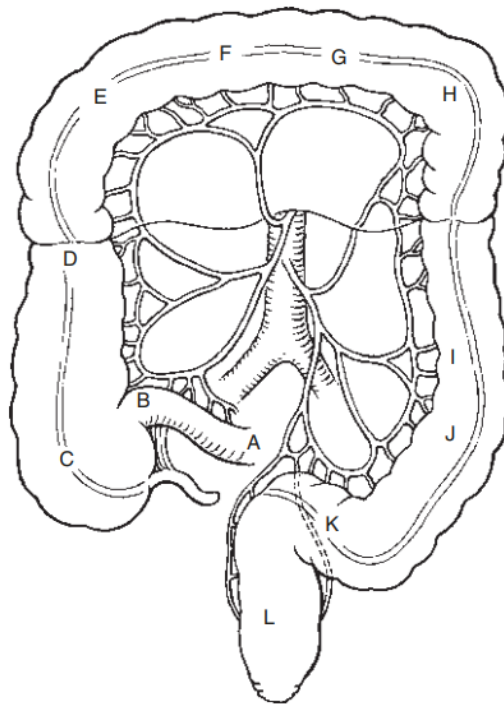


Figura 3 – Tipos de ressecções cirúrgicas de cancro colorretal. A até C: íleo-colectomia; A/B até F: hemicolectomia direita; G até I: hemicolectomia esquerda; J e K: sigmoidectomia; A/B até J: colectomia subtotal; A/B até K: colectomia total; A/B até L: proctocolectomia. Adaptado de Histopathology Specimens (5).

Existem diversas recomendações em relação ao número mínimo adequado de GL a serem isolados em amostras cirúrgicas de CCR (13,15). As recomendações da AJCC são as mais utilizadas, aconselhando a que sejam isolados 12 GL no mínimo, tendo por base o sistema de estadiamento TNM (15). Porém, diversos estudos defendem que devem ser isolados todos os GL presentes na amostra, aumentando a probabilidade de encontrar GL metastizados e, assim, obter um estadiamento mais preciso, bem como taxas de sobrevivência dos pacientes mais ajustadas (20,21).

No entanto, o diagnóstico anatomopatológico exige celeridade, estando o tratamento subsequente do paciente dependente deste diagnóstico. Torna-se mandatário otimizar as técnicas laboratoriais passíveis de serem abreviadas, como é o caso da técnica de disseção ganglionar, de forma a promover uma orientação terapêutica atempada.

A disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de CCR corresponde à última etapa do registo macroscópico e, normalmente, é realizada através de uma técnica convencional que consiste na secção do tecido adiposo em fatias com uma espessura de 5 a 10mm e a sua posterior inspeção e palpação para identificação e isolamento de GL. Esta técnica é trabalhosa e minuciosa e consome muito tempo ao patologista ou técnico que a executa. Além disso, esta técnica nem sempre é eficaz para o isolamento de GL com dimensões inferiores a 5 mm (16,18,22,23).

Johnson *et al* mostraram que apenas 22% dos casos estudados apresentavam 12 ou mais GL dissecados em amostras cirúrgicas de CCR quando se recorre à utilização da técnica convencional (24). Outros estudos exploratórios e observacionais demonstraram que ao longo dos anos o número de GL isolados tem vindo a aumentar, devido à uniformidade das normas para a disseção ganglionar (11,25). Parsons *et al* verificaram que em quatro anos a percentagem de casos com mais de 12 GL isolados subiu de 46,8% para 73,6%, assim como O'Shea *et al* que em sete anos verificaram um aumento de 69,4% para 92,9% (11,25).

Quando o número de GL isolados é inferior ao recomendado, o *College of American Pathologists* (CAP) sugere que seja realizada uma segunda disseção ganglionar ou que se recorra a técnicas adicionais (16).

Existem estudos que avaliam a eficácia de uma segunda disseção ganglionar quando o número de GL isolados é inferior ao número recomendado, como é o caso do estudo de Tran *et al*, que concluíram que uma segunda disseção permite diminuir o número de casos com menos de 12 GL (8). Estes resultados apresentaram impacto tanto em pacientes com GL positivos como com GL negativos, melhorando a qualidade da disseção e, conseqüentemente, a acurácia do estadiamento. Todavia, uma segunda disseção requer trabalho adicional e atrasos na emissão do relatório anatomopatológico (8).

De forma a combater esta problemática, ao longos dos últimos anos diversos autores têm estudado o benefício da utilização de métodos complementares que permitam uma disseção e identificação mais eficiente dos GL (22).

#### **4.2.1. Otimização da técnica de disseção ganglionar**

As amostras necessitam de ser dissecadas por profissionais de Anatomia Patológica treinados de forma a providenciar uma pesquisa de GL apropriada, para que o resultado final seja um estadiamento adequado e fiável (22).

O número mínimo de GL a ser isolado em amostras cirúrgicas de CCR nem sempre é atingido, principalmente em pacientes que receberam tratamentos neoadjuvantes, onde a dimensão dos GL é reduzida, dificultando a tarefa de disseção ganglionar (10). Outros fatores, como o tempo de fixação e a experiência de quem realiza a disseção, podem levar à inadequada identificação dos GL (10). Estes fatores podem levar a que pacientes com estadios II com pNO e menos de 12 GL isolados sejam considerados de alto risco de estadios III, levando à realização do tratamento adjuvante (17,26,27).

Nas últimas décadas têm vindo a ser estudadas novas formas que permitam otimizar a técnica convencional de disseção ganglionar, fazendo com que esta se torne mais rápida e eficaz.

Através da pesquisa bibliográfica foi possível encontrar duas formas descritas na literatura que auxiliam esta tarefa, como é o caso do recurso a soluções reveladoras de GL e a disseção ganglionar seletiva de acordo com a distância dos GL à região tumoral, que são exploradas nos subcapítulos seguintes.

#### **4.2.1.1. Soluções reveladoras de gânglios linfáticos**

Múltiplas técnicas têm vindo a ser usadas e testadas de forma a melhorar a disseção ganglionar, que vão desde métodos que permitem clarear o tecido adiposo até aos métodos que evidenciam os GL através da injeção intra-arterial com azul de metileno (27).

A pesquisa bibliográfica efetuada permitiu identificar 20 artigos que relatam a utilização das soluções reveladoras de GL na disseção ganglionar em amostras cirúrgicas de CCR (6,10,31–40,12,16,18,20,23,28–30). Na Tabela 3 encontram-se, de forma resumida, a composição das soluções, o procedimento e a tonalidade dos GL (Figura 4) de cada uma das diferentes soluções encontradas descritas na literatura. A maioria das soluções é constituída por etanol absoluto e de ácido acético glacial, que por desnaturação das proteínas, tornam os GL mais esbranquiçados e, conseqüentemente, mais facilmente identificáveis (16,26,29).

Em relação ao protocolo verifica-se que a maioria das soluções requer a submersão do tecido adiposo na solução durante um período não desprezível, à exceção da solução de azul de metileno, em que é efetuada a injeção da solução através da artéria mesentérica presente na amostra, imediatamente após a cirurgia, sendo um procedimento que exige a cooperação entre o cirurgião e o laboratório de Anatomia Patológica.

Tabela 3 – Soluções reveladoras de gânglios linfáticos utilizadas para a disseção ganglionar em amostras de cancro colorretal.

		Composição	Procedimento		Tonalidade dos gânglios linfáticos
			Técnica	Duração	
Soluções reveladoras de gânglios linfáticos	GEWF (23)	10L etanol absoluto + 3,4L água destilada + 1,6L formaldeído a 40% + 1,0L ácido acético glacial	Submersão do tecido adiposo	12h a 14h	Esbranquiçados
	RE-GEWF (18)	1280mL etanol absoluto filtrado + 160mL formaldeído a 40%+ 160mL ácido acético glacial + 0,3mL eosina-Y aquosa	Submersão do tecido adiposo	14h a 16h	Rosados
	Soluções enzimáticas (12,20)	1mg/mL de collagenase + tripsina + tampão salino	Incubação com a solução (1mL por cada 3g) a 40°C	30 a 60 min	Esbranquiçados
		0,5mg/mL de collagenase + 5mg/mL de lipase + tampão salino	Incubação com a solução (1mL por cada 3g) a 40°C	10min	
	Solução de Carnoy (31,32)	60% etanol absoluto + 30% clorofórmio + 10% ácido acético glacial	Submersão do tecido adiposo	24h a 48h	Esbranquiçados
	Solução de fat clearance (34–36)	Acetona	Submersão do tecido adiposo	24h	Esbranquiçados
		Xilol	Submersão do tecido adiposo (num processador de tecidos)	18h	
		Etanol absoluto	Submersão do tecido adiposo	24h	
Solução de azul de metileno (37)	5mL de azul de metileno + 15mL de solução salina a 0,9%	Injeção da solução na artéria da amostra	2 a 5min	Azulados	

GEWF – glacial acetic acid, absolute ethanol, destiles water e formaldehyde 40%; RE-GEWF – recycle, eosin, glacial acetic acid, absolute ethanol, distilled water e formaldehyde 40%; h – horas; min – minutos

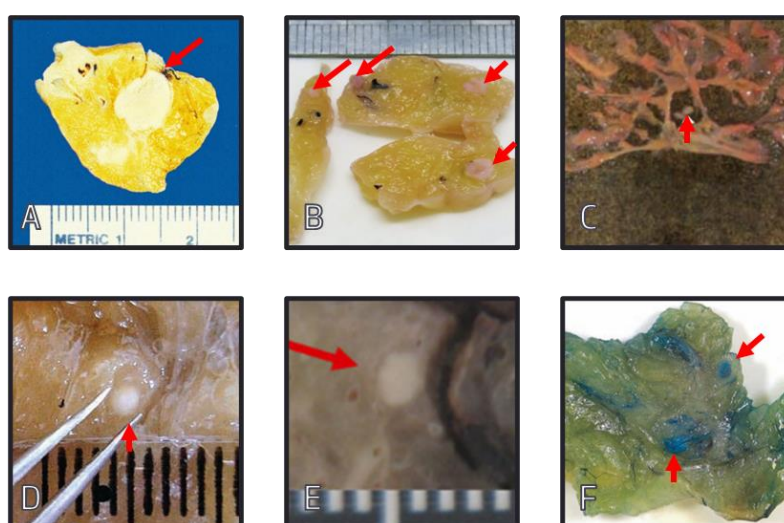


Figura 4 – Aspeto dos gânglios linfáticos (setas vermelhas) após o tratamento com as diferentes soluções reveladoras. A: GEWF (23); B: RE-GEWF (18); C: Métodos de dissociação (12); D: Solução de Carnoy (31); E: Método de fat clearance (34); F: Solução de azul de metileno(43).

#### 4.2.1.1.1. Soluções de GEWF e RE-GEWF

A solução de *Glacial acetic acid, absolute Ethanol, distilled Water e Formaldehyde* (GEWF), constituída por ácido acético glacial, etanol absoluto, água destilada e formaldeído a 40% foi descrita pela primeira vez por Lillie *et al* em 1949, como sendo uma solução segura para o utilizador, económica, de fácil preparação e utilização quando comparada com outras soluções (16,18).

Newell *et al* desenvolveram um estudo onde tinham como objetivo verificar a utilidade da solução de GEWF em amostras cirúrgicas de CCR (23). Neste estudo, a utilização da solução de GEWF levou a um aumento do número médio de GL isolados comparativamente à técnica de disseção convencional, de 6,8 para 10,2. Os autores verificaram também um aumento do número total de GL metastizados, de 41 para 82 quando utilizada a solução. Os autores concluíram que a implementação desta solução poderia ter um impacto positivo na melhoria do estadiamento deste tipo de amostras, dado que o aumento do número de GL isolados se traduziu também no aumento do número de GL metastizados (23).

Os estudos de Iversen *et al* e Gregurek *et al* tinham um objetivo semelhante ao de Newell *et al* (28,29). Em ambos, o número médio de GL e a percentagem de casos com mais de 12 GL isolados, foi superior no grupo onde foi utilizada a solução de GEWF comparativamente ao grupo onde foi realizada a técnica convencional (28,29). Contudo, contrariamente ao obtido por Newell *et al*, nenhum dos outros estudos comprovou que o aumento do número de GL teve impacto no estadiamento dos pacientes, visto que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao número de GL metastizados (28,29).

Gregurek *et al* avaliaram também as diferenças que os patologistas sentiam na facilidade da disseção ganglionar, verificando que a maioria não sentiu diferenças significativas com recurso a esta solução comparativamente à técnica convencional (29). Concluíram que, apesar de estudos anteriores obterem bons resultados com o recurso à solução de GEWF, os seus resultados não foram de encontro ao esperado, não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas na disseção quando se utiliza a solução de GEWF e a técnica convencional (29).

Horne *et al*, fizeram um estudo comparativo, usando a solução de GEWF e a uma fixação prolongada com solução aquosa de formaldeído tamponada a 4% (FT). Os resultados deste estudo mostraram que os resultados obtidos no grupo da solução de GEWF foram similares aos obtidos no grupo das amostras colocadas em FT por mais 24h numa segunda disseção ganglionar, não havendo um aumento significativo de GL positivos isolados. Apenas dois casos apresentaram aumento de estadiamento de pN0 para pN1, o que vai de encontro ao relatado nos dois estudos descritos anteriormente (10).

Yeh *et al* modificaram a solução e procedimento descritos por Newell *et al*. A sua solução continha ácido acético glacial (10%), formaldeído a 40% (80%) e etanol absoluto (10%) e a amostra era colocada nesta solução dentro de um cilindro de vidro, durante 3 horas a 60°C, de forma a reduzir o tempo de

processamento das amostras de CCR. Posteriormente, foi realizada a disseção ganglionar pelo processo similar ao da técnica convencional, sendo que os GL se tornaram mais esbranquiçados e facilmente identificáveis. Comparativamente à técnica convencional, a média de GL isolados foi superior com o recurso à solução de GEWF, 14 e 21 respetivamente. O uso desta solução permitiu um aumento da percentagem de casos com 12 ou mais GL (11,4%). Contudo nenhum dos estudos observaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito ao número de GL positivos. Não se verificaram alterações microscópicas morfológicas significativas na coloração de hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica (IHQ) (16).

Ma *et al*, de forma a otimizar o número de GL isolados sem atrasar a emissão final do relatório anatomopatológico, e minimizando os custos, propuseram a utilização de uma solução modificada da solução de GEWF, designada por RE-GEWF (do inglês, *Recycle*, *Eosin*, *Glacid acetic acid*, *absolute Ethanol*, *distilled Water* e *Formaldehyde 40%*). A grande diferença desta solução para a de GEWF é a utilização de etanol reciclado, ou seja, etanol utilizado para o passo de desidratação na coloração de HE filtrado, e de eosina, que fornece aos GL uma tonalidade rosada tornando-os mais facilmente detetáveis (18). Para isso compararam a eficácia da solução de RE-GEWF em 55 casos submetidos à técnica de disseção ganglionar convencional, 33 deles onde foram isolados menos de 12 GL e 22 deles onde foram isolados mais de 12 GL (grupo controlo) (18).

No geral, após a imersão da solução de RE-GEWF, observou-se um aumento do número de GL isolados (46%) e uma diminuição da dimensão média dos GL comparativamente ao momento da primeira disseção ganglionar (2,07mm vs. 3,45mm). No grupo onde foram isolados menos de 12 GL, após o uso da solução de RE-GEWF, a média de GL aumentou de 9,80 para 18,43, permitindo que 66,7% dos casos alcancem o número mínimo de GL recomendado para um estadiamento adequado (18).

No que diz respeito ao estadiamento, verificou-se que o aumento do número de GL isolados interferiu com o número de GL positivos, o que levou a uma alteração do estadiamento pN de 7 casos.

Apesar de todos os autores terem concluído que o recurso à solução de GEWF permitia um aumento no número de GL isolados, apenas Newell *et al* e Ma *et al* verificaram que este aumento, apresentava um impacto significativo no estadiamento dos pacientes (18,23).

#### **4.2.1.1.2. Soluções enzimáticas – método de dissociação**

O método de dissociação do tecido adiposo de amostras cirúrgicas de CCR permite a clara visualização dos GL, facilitando a sua deteção diretamente da amostra através do uso de soluções enzimáticas (20). A digestão enzimática pode ter uma duração máxima de uma hora, sem causar efeitos adversos na coloração de HE nem na IHQ (20).

Fujino *et al* descreveram este método pela primeira vez em 2014, recorrendo às enzimas colagenase e tripsina, enquanto Maeda *et al*, recorreram a uma solução comercializada composta por

colagenase e lipase (12,30). Em 2020, Fujino *et al* voltaram a testar a utilidade do método de dissociação quanto ao tempo despendido na disseção ganglionar e número de GL isolados, com uma solução de colagenase e lipase (20).

No primeiro estudo, em 2014, Fujino *et al* foram utilizadas 19 amostras de CCR onde inicialmente foi feita uma primeira disseção ganglionar através da técnica convencional. Posteriormente, o tecido adiposo foi dividido em duas partes, uma onde foi realizada uma segunda disseção pela técnica convencional e outra onde se recorreu ao método de dissociação com recurso à colagenase e à tripsina (Figura 5A) (12). Já no segundo estudo, em 2020, foram utilizadas 118 amostras, que foram divididas em dois grupos, um em que a disseção foi realizada pela técnica convencional e o outro onde a disseção ganglionar foi realizada após a digestão enzimática do tecido adiposo com recurso à colagenase e à lipase (Figura 5B) (20).

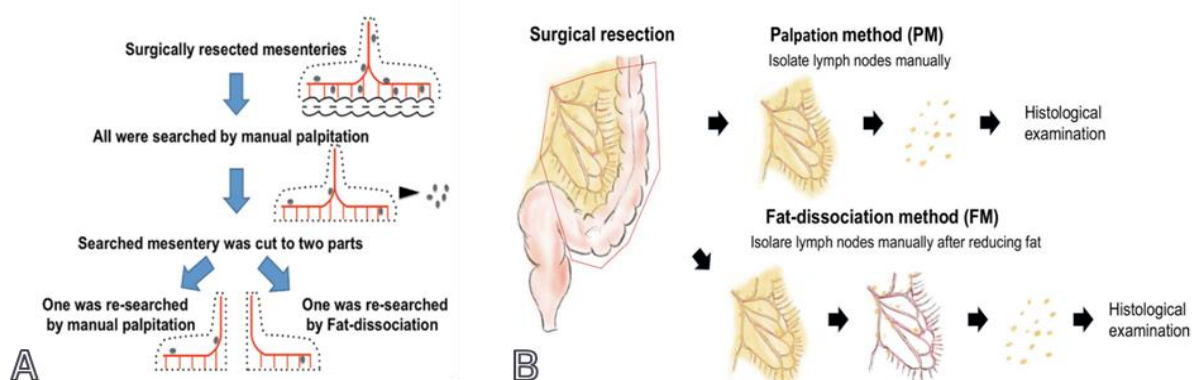


Figura 5 – Esquema representativo dos métodos utilizados por Fujino *et al*. A: Método utilizado no estudo de 2014 (12); B: Método utilizado no estudo de 2020 (20).

Após a digestão enzimática, verificou-se a desintegração da maioria do tecido adiposo, ficando evidentes as estruturas vasculares e os GL localizados em seu redor. Este método não só facilitou a identificação dos GL, como também levou à diminuição do tempo despendido na disseção ganglionar, relatado como sendo 3 vezes inferior ao tempo despendido com a técnica convencional de disseção ganglionar (12,20). Também o número médio de GL isolados foi superior com o recurso às soluções de ambos os estudos, contudo, em relação ao número de GL positivos não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (12,20).

Maeda *et al*, contrariamente a Fujino *et al*, recorreram a uma solução composta por colagenase e lipase. Selecionaram 20 amostras de CCR, onde a primeira disseção ganglionar foi realizada imediatamente após a cirurgia utilizando a técnica convencional. A segunda disseção foi realizada após a digestão com a solução enzimática, que foi injetada no tecido adiposo e posteriormente a amostra foi submersa na solução em banho-maria a 37°C por 40 a 60 minutos. Após este período foi realizada nova pesquisa de GL para exame histopatológico (30).

A média de GL isolados na primeira disseção foi de 13 por amostra, enquanto na segunda o número médio de gânglios isolados foi de 20, valor mais alto e estatisticamente significativo (30). Na segunda disseção apenas foi identificado um GL positivo, não se tendo constatado alterações no estadiamento. No que diz respeito às dimensões, verificou-se que na segunda disseção a solução enzimática permitiu o isolamento de GL de menores dimensões comparativamente à primeira disseção (4,0 vs. 7,7mm, respetivamente). Não se verificou alterações na coloração de HE nem na IHQ quando se recorre à solução (30).

Apesar do recurso ao método de dissociação ser apelativo, o facto de só poderem ser usadas em amostras a fresco, ou seja, que não foram fixadas em FT, e o custo dos reagentes necessários, são limitações da técnica que devem ser tidas em consideração.

#### **4.2.1.1.3. Solução de Carnoy**

A solução de Carnoy preserva a morfologia do tecido e permite a realização de técnicas complementares, além de clarear o tecido adiposo, fornecendo tonalidade esbranquiçada aos GL (27,31). Esta solução é composta por etanol absoluto (60%), clorofórmio (30%) e ácido acético glacial (10%), facilitando a identificação dos GL de menores dimensões (31).

Comparativamente ao fixador mais comum da rotina histopatológica, a FT, a solução de Carnoy requer os mesmos equipamentos de trabalho com medidas de segurança semelhantes, uma vez que o clorofórmio é um composto químico tóxico e carcinogénico (31).

Dias *et al* compararam em 2018, a disseção ganglionar em amostras de CCR fixadas em FT e em solução de Carnoy. Dado que alguns GL não são isolados em casos de CCR em pacientes com terapia neoadjuvante, avaliaram o número de GL isolados e o número de casos com menos de 12 GL após imersão em solução de Carnoy. Para isso, foram utilizadas 130 amostras de pacientes com excisão completa do mesorreto após terapia neoadjuvante. As amostras foram distribuídas aleatoriamente por dois grupos, um onde foi realizada a fixação com a solução de Carnoy e o outro onde a fixação foi realizada com FT. Após a disseção, as amostras do grupo da FT foram submersas em solução de Carnoy por mais 24 a 48 horas e foi realizada uma nova pesquisa de GL de forma a serem identificados GL adicionais (grupo de revisão) (31).

A média de GL isolados foi superior no grupo de solução de Carnoy quando comparado com o grupo da FT, 24,0 e 16,3, levando a que o número de casos com menos de 12 GL isolados fosse inferior no grupo da solução de Carnoy comparativamente à FT, 6 e 22, respetivamente. No grupo de revisão houve uma redução do número de casos com menos de 12 GL isolados, diminuído de 33,8% para 4,6%. Foram encontrados mais GL, 6 deles metastizados, o que resultou na alteração de estadiamento em 4 pacientes, 2 deles reclassificados com um estadiamento superior (31).

Em 2022, Dias *et al*, voltaram a estudar de que forma a solução de Carnoy tinha impacto no seu laboratório em relação ao número médio de GL isolados por amostra, uma vez que estes já obtinham um número elevado. Para isso utilizaram 60 amostras divididas em dois grupos, um em que as amostras foram tratadas com solução de Carnoy e outro onde apenas se realizou a fixação com FT. Obtiveram que a média de GL isolados foi de 36,6 no grupo da solução de Carnoy e de 26,8 no da FT. Já a duração da disseção foi semelhante nos dois grupos, 46,2 e 46,0 minutos, respetivamente. No grupo com solução de Carnoy identificaram-se mais de 12 GL em todos os casos, enquanto no grupo com FT não foi possível atingir este número em 3 amostras (32).

Ghezzi *et al* desenvolveram um estudo onde foi realizada a comparação entre a solução de Carnoy e a solução de GEWF. Após uma primeira disseção ganglionar, as amostras foram divididas aleatoriamente em dois grupos e submersas em soluções reveladoras (solução de Carnoy e solução de GEWF) durante 48h. Posteriormente, as amostras foram sujeitas a nova disseção ganglionar. A média de GL isolados aumentou em ambas as soluções (27 vs. 29,5 para a solução de GEWF e 25,2 vs. 27,7 para a solução de Carnoy) (41).

Nenhuma das soluções apresentou uma performance superior em relação aos GL metastizados encontrados adicionalmente, o que leva a que não tenham resultado mudanças significativas no estadiamento pN ou em indicações complementares de terapia adjuvante (41).

Apesar da solução de Carnoy levar a um aumento do número médio de GL isolados nos estudos apresentados, não se verificou uma diferença estatisticamente significativa no que diz respeito ao número de GL positivos. Além disso, o facto de apresentar um componente tóxico e carcinogénico, como o clorofórmio, constitui uma desvantagem para esta solução.

#### **4.2.1.1.4. Soluções de *fat clearance***

As soluções de *fat clearance* tem vindo a ser descritas como úteis para a deteção de GL de menores dimensões (16). No entanto, esta técnica não é muito usual porque utiliza componentes tóxicos, como o xilol, acetona ou etanol, e é muito demorada (cinco a sete dias, dependendo do tipo de amostra), sendo este um procedimento que está essencialmente reservado para casos onde são isolados baixos números de GL (16).

O estudo de Leung *et al* teve como objetivo verificar se a incubação do tecido adiposo em amostras de CCR em acetona permitia um aumento de GL isolados e, deste modo, a diminuição do número de pacientes com alto risco de estadio II (pacientes com menos de 12 GL isolados). Para isso, utilizaram 80 casos de ressecções cirúrgicas de CCR, onde foi realizada uma primeira disseção através da técnica convencional. De seguida, o tecido adiposo foi colocado em acetona por 24h e após esse período foi realizada uma nova disseção ganglionar. Dos 96 GL isolados positivos, 10% foram encontrados após a técnica de *fat clearance* com acetona. Antes da incubação com a solução, 49% dos pacientes tinham

menos de 12 GL isolados, mas após a incubação este número baixou para 19%, o que levou ao isolamento em média de 5 GL adicionais por amostra. Os GL adicionais isolados que eram positivos não causaram qualquer alteração no estadiamento pN. Também foram comparadas as dimensões dos GL, cuja média diminuiu de 2,6mm para 1,8mm após incubação com a acetona (34).

Prabhudesai *et al* descreveram um método que utiliza um processador de tecidos a vácuo apenas com xilol durante 18 horas. Posteriormente, as amostras eram examinadas com transiluminação de forma a visualizar os GL. Analisaram 27 casos, 12 utilizando o novo método e 15 utilizando a técnica convencional de disseção (grupo controle). O número de GL isolados foi significativamente maior no grupo de teste (31,3) quando comparado com o grupo controle (16,3). A média de GL positivos foi de 4,9 no grupo com a técnica de *fat clearance* e 3,1 no grupo controle. Verificaram também que em pacientes que receberam terapia neoadjuvante, a técnica de *fat clearance* permitiu um aumento do número de GL isolados (27,3 no grupo teste vs. 16,8 no grupo controle) e um aumento do número de GL positivos (10,3 no grupo teste vs. 3,4 no grupo controle) (35).

Wang *et al* tinham como objetivo avaliar a utilidade da técnica de *fat clearance* com etanol absoluto, especificamente em casos que receberam terapia neoadjuvante. As amostras foram divididas em dois grupos, grupo que não recebeu terapia neoadjuvante e o grupo que recebeu terapia neoadjuvante. Cada um destes grupos foi subdividido em dois grupos, um onde a disseção ganglionar ocorreu pela técnica convencional e outro onde se utilizou a técnica de *fat clearance* com etanol absoluto (36). Verificou-se que o recurso a este tipo de terapias reduz o número médio de GL isolados de 20,6 para 15,4. No grupo de terapia neoadjuvante, a técnica de *fat clearance* permitiu uma média de GL isolados superior à técnica convencional, 20,4 e 5,4, respectivamente (36).

Em termos de GL positivos, apesar de não se ter verificado um aumento com a técnica de *fat clearance* no grupo sem terapia neoadjuvante, o contrário foi verificado no grupo de terapia neoadjuvante, 0,4 vs. 1,2, respectivamente, sendo este valor estatisticamente significativo. Este fator foi confirmado através dos resultados obtidos no estadiamento pN, uma vez que no grupo sem terapia neoadjuvante não se verificaram diferenças estatisticamente significativas enquanto no grupo de terapia adjuvante se verificou uma diferença estatística no estadiamento pN no grupo de *fat clearance* (36).

Verifica-se então que o recurso à técnica de *fat clearance* permite o isolamento de um maior número de GL, tendo Wang *et al* concluindo ainda que este aumento poderá levar a alterações no sistema de estadiamento TNM, principalmente em pacientes que tiveram terapia neoadjuvante, podendo-se considerar a utilização destas soluções nesses casos (36).

O recurso a equipamentos adicionais, com necessidade de tecnologia específica, e a exposição a componentes tóxicos são desvantagens desta técnica.

#### 4.2.1.1.5. Solução de azul de metileno

O azul de metileno é um corante vital, que à temperatura ambiente tem a aparência de um sólido verde-escuro que se torna azul quando dissolvido em água (6). A utilização do azul de metileno para o mapeamento do sistema linfático foi introduzida nos anos 80 para o tratamento de melanoma (6).

A injeção da solução de azul de metileno nas artérias presentes nas amostras cirúrgicas de CCR é, em geral, simples e bem sucedida em todos os estudos encontrados (38). Esta solução quando injetada cora as artérias e os capilares, e, como os GL têm adjacente um maior número de vasos adquirem uma tonalidade mais escura do que o tecido adiposo mesocólico tornando-os facilmente identificáveis (42). Apesar de não ser claro como é que a solução se difunde para o interior dos GL quando injetada em amostras *ex vivo* (logo após a cirurgia), o mecanismo mais provável deve-se ao aumento da pressão intersticial causada pela injeção e posterior indução de fluxo linfático (6).

Markl *et al* descreveram uma técnica simples para um aumento do número de GL isolados em amostras de CCR, que se baseava na injeção *ex vivo* intra-arterial da solução de azul de metileno em amostras não fixadas, demonstrando um aumento significativo do número de GL isolados (37,43). Também Jepsen *et al* concluíram que o azul de metileno melhora a qualidade da disseção ganglionar, levando a um aumento do número médio de GL isolados de 24 para 37, que permitiu diminuir a percentagem de casos com número de GL isolados inferior ao recomendado de 7% no grupo controlo (sem injeção de azul de metileno) para 1% no grupo com azul de metileno (38).

Klepsyte *et al* e Xiao *et al*, contrariamente ao descrito por Markl *et al*, realizaram a injeção da solução de azul de metileno na artéria mesentérica inferior (6,39). No estudo de Klepsyte *et al* foram utilizadas 20 amostras onde foi injetada a solução azul de metileno e 20 amostras sem injeção da solução, que serviram de controlo. O número de GL isolados demonstrou ser estatisticamente diferente entre os dois grupos, com uma média de 18 no grupo onde foi realizada a injeção da solução de azul de metileno e de 14 no grupo controlo, assim como a percentagem de GL positivos 9,7 e 6,4, respetivamente (6).

Reima *et al* realizaram a injeção da solução de azul de metileno na sala da cirurgia imediatamente após a remoção da amostra. Foram incluídos no estudo 266 pacientes, dos quais 130 no grupo de teste (injeção da solução) e 136 no grupo controlo (sem injeção da solução). Em 9% dos casos, o processo da injeção da solução de azul de metileno não foi bem-sucedido devido a problemas na canulação ou perfuração da artéria e extravasamento da solução. A média de GL isolados foi de 27 no grupo de teste e 16 no grupo de controlo (40). Também a proporção de pacientes com 12 ou mais GL isolados foi superior no grupo de teste (86% vs. 69%), contudo o número de GL metastizados obteve uma distribuição similar em ambos os grupos, não tendo apresentado diferenças estatisticamente significativas (40).

Xiao *et al* recorreram a 172 casos de pacientes com estadio II e III de cancro retal dividindo-os em dois grupos, grupo com terapia neoadjuvante (n=86) e grupo sem terapia adjuvante (n=86). Cada um destes grupos foi subdividido em dois novos grupos: grupo onde foi realizada a injeção da solução de azul

de metileno (n=43) e o grupo controlo sem injeção da solução de azul de metileno (n=43) (39). Após 15 minutos da injeção, o cirurgião dissecou os GL através de palpação e visualização, e, posteriormente, enviou a amostra para exame anatomopatológico, sendo que os GL extra dissecados pelo patologista foram incluídos no número total de GL isolados. Foram isolados em média 22,0 no grupo de azul de metileno e 14,5 no grupo controlo. Não verificaram diferenças estatisticamente significativas entre a média de GL positivos isolados nos dois grupos (39).

Todos os autores verificaram que o número de GL isolados aumentou com o recurso à solução de azul de metileno, todavia, e em semelhança ao retratado nas soluções anteriores, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de GL isolados positivos.

Esta solução acresce ainda da necessidade da colaboração por parte da equipa cirúrgica, para ser possível a realização da injeção da solução de azul de metileno imediatamente após a resseção cirúrgica. A complexidade na execução da técnica é também uma desvantagem, pois nem sempre é possível realizar a canulação arterial corretamente.

#### 4.2.2. Comparação das soluções reveladoras de gânglios linfáticos

Na Tabela 4 encontra-se a comparação dos GL isolados com as diferentes soluções reveladoras de GL descritas na literatura. Para cada uma das soluções foi escolhido o estudo que continha as informações mais úteis para posterior comparação com as restantes.

Tabela 4 – Comparação dos resultados das diferentes soluções reveladoras com a técnica de disseção ganglionar convencional.

	GEWF		RE-GEWF		Solução enzimática		Solução de Carnoy		Solução de fat clearance		Solução de azul de metileno	
	Newell <i>et al</i> (23)		Ma <i>et al</i> (18)		Fujino <i>et al</i> (20)		Dias <i>et al</i> (31)		Leung <i>et al</i> (34)		Märkl <i>et al</i> (37)	
	TC	SR	TC	SR	TC	SR	TC	SR	TC	SR	TC	SR
Número de amostras	32	35	55		65	65	65	65	80		29	30
Média de número de GL isolados	6,8	10,2	9,8	18,4	16,0	18,0	16,3	24,0	12	18	11,7	23,2
Razão entre as médias dos GL isolados*	1,5		1,9		1,1		1,5		1,5		2,0	
Dimensão média dos GL (mm)	7,0	5,0	3,5	2,1	NI	NI	NI	NI	2,6	1,8	6	4
Média do número de GL metastizados	1,3	2,3	1,3	1,5	0	0	0,8	1,1	2	2	1,0	1,2
Número de amostras com <12 GL isolados	NI	NI	33	11	NI	NI	22	6	39	15	8	1
Coloração de HE e IHQ	SA		NI		SA		NI		SA		SA	
Média de tempo despendido na disseção ganglionar	NI		NI		NI		49,0	45,7	45	15	NI	

\* Razão entre as médias de GL isolados com a solução reveladora e o método convencional

TC – técnica convencional; SR – solução reveladora; NI – não informado; SA – sem alterações; HE – hematoxilina e eosina; IHQ – imunohistoquímica

Através da análise da Tabela 4 pode verificar-se que a razão entre as médias dos GL isolados da técnica convencional de disseção e os métodos das soluções foi sempre superior a 1, o que significa que o recurso a estas soluções permite um aumento do número de GL isolados tendo assim impacto na qualidade da disseção ganglionar, uma vez que na maioria dos casos o número mínimo de GL recomendado é atingido com a utilização das soluções.

No que diz respeito às dimensões dos GL, verifica-se que, em todos os artigos, a dimensão média dos GL diminui com a utilização destas soluções.

Em relação ao tempo despendido na disseção ganglionar, apenas dois autores tiveram em conta esses fatores, sendo que apenas Leung *et al* verificou uma diferença estatisticamente significativa com o recurso à solução de *fat clearance*, uma vez que quando se recorre a esta técnica o tempo de disseção ganglionar diminui três vezes. É importante ter em conta a duração do procedimento associado a cada solução reveladora. O tempo varia entre 10 minutos e 48 horas, sendo impreterível avaliar o impacto no atraso do diagnóstico anatomopatológico, quando se recorre a determinadas soluções.

O sistema de estadiamento TNM não mostrou alterações na maioria dos artigos, mesmo com um maior número de GL isolados. Apenas Newell *et al*, Ma *et al* e Wang *et al* verificaram que as soluções de GEWF, de RE-GEWF e a solução de *fat clearance*, respetivamente, permitiram alterações significativas no estadiamento pN dos pacientes. Wang *et al* concluíram ainda, que esta situação se verifica principalmente em casos de pacientes com tratamento neoadjuvante.

#### 4.2.3. Disseção ganglionar seletiva de acordo com a distância dos gânglios linfáticos ao tumor

A contribuição dos GL mais distantes à região do tumor primário não é investigada quando são realizadas as recomendações do número mínimo de GL, e o seu papel não é tido em conta no estadiamento pN (17).

A extensão das ressecções cirúrgicas do CCR está relacionada essencialmente com a vascularização do cólon e do reto, levando à ressecção de regiões mais amplas do que as consideradas estritamente necessárias (44). O isolamento sistemático de GL localizados relativamente longe no tecido adiposo mesocólico/mesorreto em amostras de CCR não só acarreta custos para o laboratório como também aumenta o tempo despendido nesta tarefa, existindo poucos estudos que abordem o potencial impacto no estadiamento pN (17).

Durante a pesquisa bibliográfica foram encontrados 3 artigos, que de forma similar, tentaram perceber a distribuição dos GL pela ressecção cirúrgica de CCR e quais as vantagens de uma disseção ganglionar seletiva (17,44,45). Todos os autores tinham como objetivo avaliar a distância dos GL ao tumor primário, sendo que Cserni *et al* e M. Pusztaszeri *et al* queriam ainda avaliar a importância do isolamento dos GL mais distantes e, de que forma esta característica poderia ser um fator que permitiria otimizar a disseção ganglionar (17,45). No caso do estudo de Ueno *et al* o objetivo era determinar o comprimento ideal para as ressecções de cancro do cólon, avaliando também a distância da localização de GL metastizados ao tumor primário (44).

De forma a atingir os seus objetivos, todos os autores realizaram a divisão do tecido adiposo em diferentes regiões tendo em conta a distância ao tumor primário (D) (Figura 6). No estudo de Ueno *et al* a divisão do tecido adiposo mesocólico foi realizada *in vivo*, no momento da cirurgia, com fios de sutura, de forma a garantir que as condições se mantinham sempre semelhantes às *in vivo*, tendo a disseção ganglionar sido realizada pelos cirurgiões e não pelos patologistas/técnicos como Cserni *et al* e de M. Pusztaszeri *et al* (17,44,45).

O tecido adiposo foi separado segundo as regiões definidas pelos autores, e a disseção ganglionar de cada região foi realizada individualmente, permitindo posteriormente comparar os GL isolados por região.

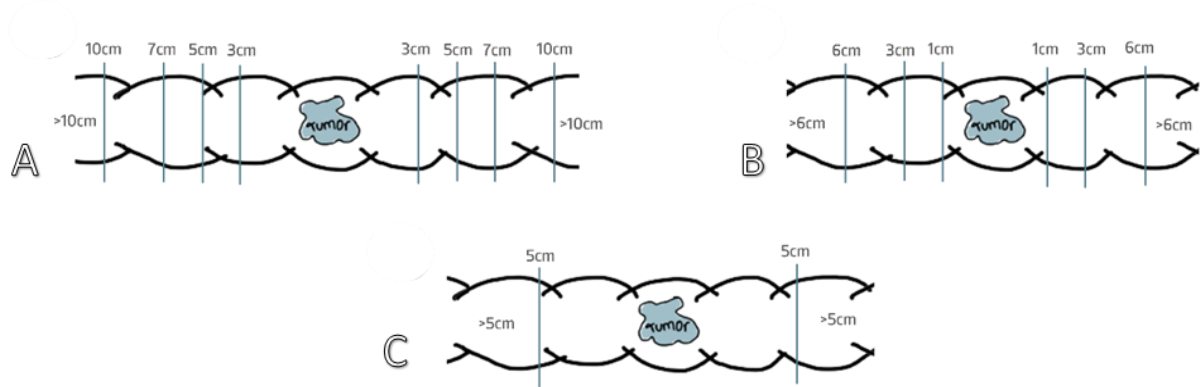


Figura 6 – Esquemas representativos da divisão do tecido mesocólico durante a disseção ganglionar, de acordo com cada metodologia. A: Ueno et al (44); B: Cserni et al (45); C: M. Pusztaszeri et al (17).

Apesar de terem dividido o tecido adiposo mesocólico em momentos distintos e em secções de dimensões distintas, é possível comparar os resultados obtidos pelos autores. Na Tabela 5 encontra-se a informação obtida destes três artigos de forma sumarizada.

Todos os autores verificaram que, na região mais próxima ao tumor, a média de GL isolados é superior à das regiões mais distantes, observando-se que este número diminui à medida que a distância ao tumor primário aumenta, fator que pode ser avaliado principalmente nos estudos de Ueno *et al* e de Cserni *et al*(44,45).

Em relação à percentagem de GL metastizados, observa-se também que a maior percentagem se verifica nas regiões mais próximas ao tumor e que esta também diminui à medida que a distância ao tumor aumenta. Apesar de Ueno *et al* não descreverem a percentagem de GL metastizados, verificaram que 40,7% dos pacientes com metástases ganglionares, apresentavam GL positivos na região  $0 < D \leq 3$ cm. Já Cserni *et al* obtiveram apenas um caso onde foram encontrados GL metastizados na região de  $1 < D \leq 3$  cm, sem se verificar a sua presença na região mais próxima ( $0 < D \leq 1$ cm) (44,45).

Tabela 5 – Distribuição dos gânglios linfáticos isolados em relação à distância ao tumor, em cada um dos estudos.

	Ueno <i>et al</i> (44)					Cserni <i>et al</i> (45)				M. Pusztaszeri <i>et al</i> (17)	
	0<D≤3 cm	3<D≤5 cm	5<D≤7 cm	7<D≤10 cm	D>10 cm	0<D≤1 cm	1<D≤3 cm	3<D≤6 cm	D>6 cm	0<D≤5 cm	D>5 cm
Número de casos	2996					100				345	
Média de GL isolados	5,1	3,8	3,2	2,7	1,1	10,6	3,3	1,9	2,0	13,5	4,9
Percentagem de GL metastizados (%)	NI					82,3	14,0	2,6	1,1	85	15

D – Distância ao tumor primário; GL – gânglios linfáticos; NI- não informado

M. Pustaszeri *et al* verificaram ainda que 27% dos casos obtiveram menos de 12 GL isolados quando considerado todo o tecido adiposo, percentagem que aumenta para 46% quando considerada apenas a região mais próxima ao tumor ( $0 < D \leq 5$ cm). Verificou ainda que um maior número de GL foram isolados em tumores com estadiamento pT3 e pT4 (17). Este resultado realça a relação entre o estadiamento T e o número de GL detetáveis.

No que diz respeito ao estadiamento pN, Ueno *et al* verificaram que apenas 4 dos seus casos (0,1%) apresentava metástases a mais de 10cm do tumor primário, e que esses foram casos diagnosticados com estadiamento pT3 e pT4a (44). Cserni *et al* verificaram que tendo em conta apenas os GL isolados na região do tumor primário e a 1cm proximal e distal, a percentagem de falsos negativos foi de apenas 1,9% e quando a disseção é alargada até aos 3cm proximais e distais ao tumor, o estadiamento não apresenta alterações. M. Pustaszeri *et al* observaram que quando eram considerados apenas os GL isolados na região mais próxima ao tumor, o estadiamento apresentava uma acurácia de 97% (17). Quando considerado todo o tecido adiposo, 6 dos casos passaram de estadiamento pN0 para pN1 e 4 passaram de pN1 para pN2.

Por isso, os autores defendem que, uma vez que a técnica de disseção ganglionar é uma técnica morosa, o isolamento de GL mais distantes à região do tumor primário pode não contribuir significativamente para o estadiamento pN. Limitando-se a área de disseção ganglionar é esperado que a percentagem de casos com menos de 12 GL isolados aumente, contudo, as percentagens de acurácia no estadiamento pN em todos os estudos foi superior a 95% (17,44,45).

## 5. Discussão/Conclusão

No CCR, o estadiamento pN após a ressecção cirúrgica é crucial para o prognóstico e para a decisão terapêutica. Para além da cirurgia, nenhum tratamento é recomendado quando não existe evidência de GL metastizados ou de metástases à distância (46). Contudo, existem algumas condições bem definidas que podem determinar a aplicação de tratamento adjuvante em alguns casos, nomeadamente, o isolamento de menos de 12 GL (47).

A técnica convencional, que consiste na disseção com inspeção manual e palpação do tecido adiposo mesocólico, para identificar os GL, é trabalhosa e morosa. Apesar de ser a técnica mais aceite para a disseção ganglionar em casos de CCR, nem sempre é isolado o número mínimo de GL recomendado. Os casos de CCR com terapia neoadjuvante são desafiantes, pois os GL tornam-se mais pequenos e fibrosos, não sendo possível isolar 12 GL, mesmo após uma segunda observação do tecido adiposo (18). Isto leva a que GL de menores dimensões, onde podem existir micrometástases (0,2-2mm) ou até macrometástases (>2mm), possam não ser isolados, sugerindo que um grande número de pacientes com CCR possa ter um estadiamento incorreto (16-18,33). O estado imunológico do paciente parece ter influência no número de GL avaliados e no prognóstico. Um forte infiltrado linfocitário causa a hiperplasia dos GL e, conseqüentemente, o aumento das suas dimensões, tornando-os mais facilmente identificáveis durante a disseção ganglionar (45).

Um maior número de GL isolados encontra-se associado a um sistema de estadiamento TNM mais fidedigno e, conseqüentemente, uma melhoria na sobrevivência (47).

Nos últimos anos, alguns autores sugeriram que a avaliação de todo o tecido adiposo mesocólico/mesorretal poderia ser vantajosa para a melhoria da disseção ganglionar, como é o caso de Brown *et al*, que obtiveram que mais de 50% dos GL encontrados adicionalmente tinham diâmetro inferior a 1mm, sendo muito dificilmente isolados através da técnica convencional (48). Contudo, a examinação microscópica de todo o tecido adiposo torna-se uma tarefa exaustiva e que acarreta custos adicionais para o laboratório, sendo necessário comprovar que a sua utilização trará impacto no estadiamento e no tratamento do paciente (18).

No presente estudo, foi possível identificar dois métodos descritos na literatura que permitem tornar a disseção ganglionar numa tarefa mais facilitada, assegurando a sua qualidade, sendo eles o recurso a soluções reveladoras e a disseção ganglionar seletiva, de acordo com a distância dos GL ao tumor.

Nos estudos com as soluções reveladoras, verificou-se que os GL se tornam mais facilmente identificáveis, dado que estas soluções, usualmente, alteram a cor dos GL tornando-os distinguíveis do tecido adiposo circundante (16). Foi possível constatar que o número de GL isolados, bem como o número de GL metastizados, são superiores quando são utilizadas estas soluções em comparação com a técnica de disseção convencional. Estas soluções parecem também aumentar a eficácia da disseção de GL de menores dimensões, uma vez que se verifica que com o recurso a qualquer uma das soluções reveladoras, as

dimensões dos GL isolados é inferior às dimensões médias dos GL isolados através da técnica convencional. (12). No entanto, as soluções enzimáticas descritas por Fujino *et al* demonstraram ser as que apresentaram a razão entre as médias de GL isolados com a solução reveladora e o método convencional mais baixa quando comparado com as restantes soluções (49). Embora alguns estudos refiram que não foram encontradas interferências na coloração de HE e na IHQ, nenhum especificou detalhes sobre as técnicas utilizadas nem sobre os critérios utilizados para a avaliação dos resultados, sendo esta uma limitação dos estudos encontrados.

A injeção da solução de azul de metileno demonstrou ser a técnica com melhores resultados, uma vez que são isolados duas vezes mais GL do que com o uso do método convencional. Esta é uma técnica rápida que parece aumentar a eficácia da disseção ganglionar, com o recurso a um reagente não tóxico de fácil utilização e, normalmente, disponível num laboratório de Anatomia Patológica (42).

Contudo, também existem limitações associadas à injeção da solução de azul de metileno, nomeadamente, o facto da sua injeção nem sempre ser um procedimento fácil, dado que requer conhecimento e experiência para a canulação das artérias mesentéricas (40). O facto de na maioria dos estudos a injeção ser realizada pelo cirurgião, imediatamente após a cirurgia, é um fator a considerar aquando da avaliação dos resultados. É necessária a realização de estudos adicionais que verifiquem a utilidade desta solução se a injeção for realizada no momento do exame macroscópico, após fixação em FT, de forma a mimetizar a realidade dos laboratórios. Será expectável uma taxa de difusão mais lenta e uma maior dificuldade na canulação da artéria, levando obrigatoriamente a um aumento do tempo do procedimento ou até à ineficácia da injeção.

Não existe consenso em relação à superioridade das soluções reveladoras de GL relativamente à técnica convencional. Apesar dos bons resultados obtidos, estas soluções têm vindo a ser associadas com algumas limitações, como o aumento do tempo consumido para a realização dos procedimentos, eventual toxicidade das soluções utilizadas e custos, uma vez que com o aumento de número de GL isolados aumentará também o número de blocos por exame (16,29).

O facto de não se terem identificado alterações significativas no estadiamento dos pacientes, mesmo com o recurso a este tipo de soluções, na maioria dos estudos encontrados, levam a questionar o real benefício da sua utilização. Por isso, a questão não passa tanto por qual solução deverá ser utilizada, mas sim se os pacientes beneficiam da sua utilização (16). Em casos em que através do método convencional já são isolados GL metastizados que levam ao estadiamento pN2, o recurso às soluções reveladoras não adiciona nenhuma informação adicional no que diz respeito ao prognóstico ou tratamento, o que leva à consideração de se o aumento de GL isolados será relevante para os pacientes (16).

Contudo, deve ser tido em consideração que apesar dos resultados obtidos e das desvantagens verificadas pelas soluções, estas podem ter um papel importante em situações mais específicas, onde o número mínimo recomendado não é atingido. Em casos submetidos a terapias neoadjuvantes, ressecções

cirúrgicas de segmentos curtos de cólon/reto e ressecções retais com mesorreto incompleto (devido à qualidade da cirurgia) e ainda na eventualidade de pouca experiência na realização da disseção ganglionar, o uso de soluções reveladoras poderá ser aconselhado (34). É por isso necessária a realização de mais estudos direcionados para comprovar a veracidade destes resultados.

Mais recentemente têm surgido estudos que demonstram que os GL não se distribuem da mesma forma ao longo de todo o tecido adiposo adjacente ao segmento do cólon e do reto, e que a sua localização está essencialmente relacionada com a proximidade à região do tumor primário, levantando a questão da importância do isolamento dos GL mais distantes ao tumor, algo que até então muito raramente foi abordado na literatura (17).

No que diz respeito ao número de GL isolados e a sua relação com a localização do tumor, *Guan et al*, verificaram no seu estudo que o número médio de GL isolados por caso foi superior em neoplasias localizadas no cólon direito (18,7 vs. 16,3) (50). Verificaram também que 80% dos casos com neoplasias do cólon direito obtiveram 12 ou mais GL isolados enquanto em neoplasias do cólon esquerdo isso só foi possível em 68,3% dos casos. Este autor sugere que os *cut-off* para o número mínimo de GL isolados sejam determinados consoante a localização do tumor, não aplicando assim o número mínimo recomendado de 12 GL isolados. Sugere por isso, segundo os resultados obtidos no seu estudo, um *cut-off* de 15 GL para neoplasias do cólon direito e de 11 GL para neoplasias do cólon esquerdo (50).

Apesar de alguns autores sugerirem que sejam isolados o maior número possível de GL, na opinião do grupo de trabalho de M. Puztaszeri *et al* o dilema não está necessariamente relacionado com o número de GL que deve ser isolado mas sim como detetar os GL que são mais suscetíveis a serem metastizados (17). Por isso, realizar uma disseção seletiva dos GL diminuiria o tempo necessário para isolar os GL no tecido adiposo mesocólico, permitindo ainda assim um estadiamento adequado (45).

Em relação à distância dos GL à região do tumor primário, *Ueno et al*, *Cserni et al* e *M. Puztaszeri et al*, obtiveram resultados semelhantes, verificando que a média do número de GL isolados nas regiões mais distantes ao tumor é significativamente inferior do que nas regiões mais próximas. Verificaram também que o número de GL aumenta linearmente com o estadiamento pT. Isto vai de acordo ao postulado, que o número total de GL isolados depende primeiramente da distância ao tumor e se não existirem doenças inflamatórias associadas, os GL identificados através da técnica convencional utilizada para a disseção ganglionar estarão localizados mais proximamente ao tumor, e a distâncias superiores a 5cm serão encontrados GL de menores dimensões, sendo nesta localização menos provável a identificação de GL metastizados (17).

Uma vez que a tarefa de disseção ganglionar consome muito tempo e acarreta custos para os laboratórios de Anatomia Patológica, o isolamento de GL mais distantes pode não adicionar uma contribuição significativa para o estadiamento pN. *Cserni et al* e *M. Puztaszeri et al* demonstraram ainda que a acurácia do estadiamento depende principalmente dos GL isolados no tecido mesocólico mais próximo do tumor primário (17,45).

Kukreja *et al* estudaram de que forma um aumento de GL isolados aumentaria a proporção de pacientes com estadios III e, conseqüentemente, o número de GL positivos encontrados por caso (51). Obtiveram que apesar de haver um aumento significativo de GL isolados, não se observou um aumento de pacientes com estadios III de CCR, nem um aumento de casos com estadiamento pN2, ou seja, estes não tiveram impacto no estadiamento dos pacientes refutando a teoria de *stage migration*, também chamada de fenómeno de Will Rogers (51). Esta teoria afirma que, um baixo número de GL isolados implica o risco de não serem avaliados GL metastizados. Pacientes com estadios III de CCR correm o risco de serem diagnosticados erroneamente com estadios II se o número isolado de GL não atingir o número mínimo recomendado isolados (6).

Contudo, apesar no número de GL isolados tenha tendência a aumentar nas últimas décadas, devido a melhores padrões de cirurgia e a introdução de novas técnicas de disseção, o número GL positivos não aumentou, o que pode dever-se ao facto dos GL metastáticos por vezes apresentarem maiores dimensões e serem mais facilmente detetados.

Em suma, não existe consenso sobre o número ótimo de GL isolados devendo-se manter as recomendações do número mínimo de 12 GL. Através da realização desta revisão bibliográfica, no que diz respeito às soluções reveladoras de GL, apesar do maior número de GL isolados, são necessários mais estudos multicêntricos para demonstrar o impacto no estadiamento, assim como o impacto destas soluções nas técnicas complementares de diagnóstico como a IHQ e técnicas de biologia molecular. De uma forma geral, o uso destas soluções aumenta o tempo de resposta do exame anatomopatológico, pelo que será benéfico definir critérios para a sua utilização em situações específicas.

Em relação à distância dos GL ao tumor primário, sugere-se iniciar a disseção ganglionar pelo tecido mesocólico localizado a 5cm distais/proximais da região do tumor primário como uma forma de rentabilizar o tempo despendido nesta tarefa, contudo, são necessários mais estudos para comprovar que esta disseção seletiva não terá implicações no estadiamento.

Propõe-se ainda que sejam utilizados os dois métodos descritos de forma complementar. Tendo em conta a categorização em estadios de CCR, sugere-se inicialmente ser realizada uma disseção ganglionar seletiva nos 5cm proximais e distais à região do tumor. Em casos em que não fossem encontrados 12 GL, recorrer-se-ia à extensão da área de disseção e ao uso das soluções reveladoras. Este procedimento iria permitir realizar o exame macroscópico com maior celeridade, promovendo ainda a eficiência da disseção ganglionar e conseqüente estadiamento adequado.

## 6. Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. Globocan. 2020 [cited 2023 Apr 1]. Cancer today. Available from: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=620&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=620&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)
2. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 10th ed. Elsevier; 2018. 630–634 p.
3. ID N, MJ A, AK ORL. Tumours of colon and rectum. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, editor. Digestive System Tumours. 5th ed. 2019. p. 157–77.
4. Serviço Nacional de Saúde. Rastreamento do cancro colorretal [Internet]. 2018 [cited 2023 Apr 25]. Available from: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2018/02/12/rastreamento-do-cancro-colorretal/>
5. Allen DC, Cameron RI, Loughrey MB. Colorectum. In: Allen DC, Cameron RI, editors. Histopathology Specimens. 3rd ed. Springer; 2017. p. 67–85.
6. Klepšte E, Evaldas Samalavičius N. Injection of methylene blue solution into the inferior mesenteric artery of resected rectal specimens for rectal cancer as a method for increasing the lymph node harvest. *Tech Coloproctol*. 2012;16(3):207–11.
7. Švec A, Horák L, Novotný J, Lysý P. Re-fixation in a lymph node revealing solution is a powerful method for identifying lymph nodes in colorectal resection specimens. *Eur J Surg Oncol*. 2006;32(4):426–9.
8. Tran C, Howlett C, Driman DK. Evaluating the impact of lymph node resampling on colorectal cancer nodal stage. *Histopathology*. 2020;77(6):974–83.
9. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. Organization of the AJCC Cancer Staging Manual. In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. Springer; 2018. p. 31–6.
10. Horne J, Carr NJ, Bateman AC, Kandala NII, Adams J, Silva S, et al. A comparison of formalin and GEWF in fixation of colorectal carcinoma specimens: rates of lymph node retrieval and effect on TNM staging. *J Clin Pathol*. 2015;69(6):511–7.
11. O’Shea A, Aly O, Parnaby CN, Loudon MA, Samuel LM, Murray GI. Increased lymph node yield in colorectal cancer is not necessarily associated with a greater number of lymph node positive cancers. *PLoS One*. 2014;9(8):1–10.
12. Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Noura S, Tomita Y, Yano M, et al. New enhanced and effective method for staging cancer to detect lymph nodes after fat-dissociation. *Oncol Rep*. 2014;32(3):922–6.
13. College of American Pathologists. Protocol for the Examination of Resection Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. 2022.

14. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst Rev.* 2021;10(1):1–11.
15. Jessup JM, Goldberg RM, Brierley JD, Compton CC, Goodman KA, Schumacher–Penberthy LT. Colon and Rectum. In: Cancer AJC on, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. 2016. p. 252–71.
16. Yeh CC, Pan CF, Liu HW, Lin JC, Fang LH, Lee HS, et al. Using the Fat-Clearing Technique to Improve Lymph Node Retrieval in Colorectal Cancer. *Int J Surg Pathol.* 2021;29(4):385–91.
17. Pusztaszeri M, Matter M, Kuonen A, Bouzourene H. Nodal staging in colorectal cancer: should distant lymph nodes be recovered in surgical specimens? *Hum Pathol [Internet]*. 2009;40(4):552–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2008.08.016>
18. Ma XL, Ye JX, Su J, Qi FF, Meng QY, Shi XY. A modified GEWF solution is cost-saving and effective for lymph node retrieval in resected colorectal carcinoma specimens. *Pathol Res Pract [Internet]*. 2014;210(9):543–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2014.05.004>
19. Lindboe CF. Lymph node harvest in colorectal adenocarcinoma specimens: The impact of improved fixation and examination procedures. *Apmis.* 2011;119(6):347–55.
20. Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Ito A, Yasui M, Ogino T, et al. A new fat-dissociation method to detect lymph nodes in colorectal cancer: a prospective randomized study. *Sci Rep.* 2020;10(1):1–8.
21. Wu W, Li D, Ma W, Zheng S, Han D, Xu F, et al. Examining More Lymph Nodes May Improve the Prognosis of Patients With Right Colon Cancer: Determining the Optimal Minimum Lymph Node Count. *Cancer Control.* 2021;28:1–14.
22. McDonald JR. Lymph node harvest in colon and rectal cancer: Current considerations. *World J Gastrointest Surg.* 2012;4(1):9.
23. Newell KJ, Sawka BW, Rudrick BF, Driman DK. GEWF Solution: An Inexpensive, Simple, and Effective Aid for the Retrieval of Lymph Nodes From Colorectal Cancer Resections. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(May).
24. Johnson PM, Malatjalian D, Porter GA. Adequacy of nodal harvest in colorectal cancer: A consecutive cohort study. *J Gastrointest Surg.* 2002;6(6):883–90.
25. Parsons HM, Tuttle TM, Kuntz KM, Begun JW, McGovern PM, Virnig BA. Association between lymph node evaluation for colon cancer and node positivity over the past 20 years. *Jama.* 2011;306(10):1089–97.
26. Profeta da Luz MM, Lacerda-Filho A, Demas Alvares Cabral MM, Maciel da Fonseca L, de Almeida Araújo S, de Almeida Sanches SR, et al. The role of lymph node revealing solution on the improvement of lymph node harvest in colorectal cancer specimens. *Color Dis.* 2016;18(3):247–54.
27. Flynn SM, Burchette RJ, Ghassemi M, Ratner O, Mandel D, Tomassi MJ, et al. Carnoy's solution fixation with compression significantly increases the number of lymph nodes yielded from

- colorectal cancer specimens. *J Surg Oncol.* 2019;119(6):766–70.
28. Iversen LH, Laurberg S, Hagemann–Madsen R, Dybdahl H. Increased lymph node harvest from colorectal cancer resections using GEWF solution: A randomised study. *J Clin Pathol.* 2008;61:1203–8.
  29. Gregurek SF, Wu HHJ. Can GEWF solution improve the retrieval of lymph nodes from colorectal cancer resections? *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(1):83–6.
  30. Maeda H, Okamoto K, Oba K, Shiga M, Fujieda Y, Namikawa T, et al. Lymph node retrieval after dissolution of surrounding adipose tissue for pathological examination of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(2):2495–500.
  31. Dias AR, Pereira MA, De Mello ES, Nahas SC, Cecconello I, Ribeiro U. Lymph node yield after neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer specimens: A randomized trial comparing two fixatives. *Dis Colon Rectum.* 2018;61(8):888–96.
  32. Dias AR, Pereira MA, Mello ES, Cecconello I, Ribeiro–JR U, Nahas SC. Carnoy's solution increases lymph nodes count in colon cancer specimens when compared to formalin Fixation: a randomized trial. *Arq Bras Cir Dig.* 2022;34(2):1–6.
  33. Ghezzi TL, Pereira MP, Corleta OC, Kalil AN. Carnoy solution versus GEWF solution for lymph node revealing in colorectal cancer: a randomized controlled trial. *Int J Colorectal Dis.* 2019;34(12):2189–93.
  34. Leung CAW, Fazzi GE, Melenhorst J, Rennspiess D, Grabsch HI. Acetone clearance of mesocolic or mesorectal fat increases lymph node yield and may improve detection of high-risk Stage II colorectal cancer patients. *Color Dis.* 2018;20(11):1014–9.
  35. Prabhudesai AG, Dalton P, Kumar D, Finlayson CJ. Mechanised one-day fat clearance method to increase the lymph node yield in rectal cancer specimens. *Br J Biomed Sci.* 2005;62(3):120–3.
  36. Wang H, Safar B, Wexner SD, Denoya P, Berho M. The clinical significance of fat clearance lymph node harvest for invasive rectal adenocarcinoma following neoadjuvant therapy. *Dis Colon Rectum.* 2009;52(10):1767–73.
  37. Märkl B, Kerwel TG, Wagner T, Anthuber M, Arnholdt HM. Methylene blue injection into the rectal artery as a simple method to improve lymph node harvest in rectal cancer. *Mod Pathol [Internet].* 2007;20(7):797–801. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.3800824>
  38. Jepsen RK, Ingeholm P, Lund EL. Upstaging of early colorectal cancers following improved lymph node yield after methylene blue injection. *Histopathology.* 2012;61(5):788–94.
  39. Xiao J, Zhang H, Jiang D, Deng X, Wang Z. Lymph node stain after radical resection of rectal cancer mainly increased the harvest of mini lymph node: A randomized controlled trial. *Int J Colorectal Dis [Internet].* 2023;38(1). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00384-023-04323-x>
  40. Reima H, Saar H, Innos K, Soplepmann J. Methylene blue intra-arterial staining of resected

- colorectal cancer specimens improves accuracy of nodal staging: A randomized controlled trial. *Eur J Surg Oncol* [Internet]. 2016;42(11):1642–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2016.06.001>
41. Ghezzi TL, Pereira MP, Corleta OC, Kalil AN. Carnoy solution versus GEWF solution for lymph node revealing in colorectal cancer: a randomized controlled trial. *Int J Colorectal Dis*. 2019;34(12):2189–93.
  42. Albatanony A, Alseesi A, Ammar M, Shaaban M. Improving lymph node harvest in colorectal cancer by intra-arterial injection of methylene blue: a randomized trial. *Egypt J Surg*. 2015;34(2):99.
  43. Märkl B, Kerwel TG, Jähmig HG, Oruzio D, Arnholdt HM, Schöler C, et al. Methylene blue-assisted lymph node dissection in colon specimens: A prospective, randomized study. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(6):913–9.
  44. Ueno H, Hase K, Shiomi A, Shiozawa M, Ito M, Sato T, et al. Optimal bowel resection margin in colon cancer surgery: prospective multicentre cohort study with lymph node and feeding artery mapping. *Lancet Reg Heal - West Pacific* [Internet]. 2023;100680. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lanwpc.2022.100680>
  45. Cserni G, Tarján M, Bori R. Distance of lymph nodes from the tumor: An important feature in colorectal cancer specimens. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125(2):246–9.
  46. Zhang CH, Li YY, Zhang QW, Biondi A, Fico V, Persiani R, et al. The prognostic impact of the metastatic lymph nodes ratio in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2018;8(DEC).
  47. Schrembs P, Martin B, Anthuber M, Schenkirsch G, Märkl B. The prognostic significance of lymph node size in node-positive colon cancer. *PLoS One*. 2018;13(8):1–13.
  48. Brown HG, Luckasevic TM, Medich DS, Celebrezze JP, Jones SM. Efficacy of manual dissection of lymph nodes in colon cancer resections. *Mod Pathol*. 2004;17(4):402–6.
  49. Fujino S, Miyoshi N, Ohue M, Ito A, Yasui M, Ogino T, et al. A new fat-dissociation method to detect lymph nodes in colorectal cancer: a prospective randomized study. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77195-8>
  50. Guan X, Chen W, Liu Z, Jiang Z, Hu H, Zhao Z, et al. Whether regional lymph nodes evaluation should be equally required for both right and left colon cancer. *Oncotarget*. 2016;7(37):59945–56.
  51. Kukreja SS, Esteban-Agusti E, Velasco JM, Hieken TJ. Increased lymph node evaluation with colorectal cancer resection: Does it improve detection of stage III disease? *Arch Surg*. 2009;144(7):612–6.