

# INFLUÊNCIA DA TÉCNICA CIRÚRGICA NA IMPLANTAÇÃO DA CARCINOMATOSE PERITONEAL EM FERIDA OPERATÓRIA: MODELO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

*Influence of surgical technique in the peritoneal carcinomatosis surgical wound implant: experimental model in mice*

Roberto Maranhão **ROSA**, Rafael Coelho **CAIADO**, Paulo Roberto de Melo **REIS**,  
 Elisângela de Paula Silveira **LACERDA**, Denis Masashi **SUGITA**, Fátima **MRUÉ**

Trabalho realizado no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnologia, Campus II, Pontifícia Universidade Católica, Goiânia, Goiás, Brasil.

**RESUMO: Racional:** O número de neoplasias vem aumentando de maneira preocupante. O tratamento cirúrgico constitui-se em uma das modalidades terapêuticas mais eficientes para os tumores sólidos. O implante neoplásico em ferida operatória é complicação cujo percentual de ocorrência relatado na literatura é variável, porém configura alta morbidade e grande dificuldade terapêutica. A proteção da ferida operatória é um dos princípios de cirurgia oncológica recomendados, entretanto pouco estudado. **Objetivo:** Avaliar a influência da proteção de ferida operatória no desenvolvimento de implante tumoral na ferida operatória. **Métodos:** Foram utilizadas linhagens de células tumorais do Sarcoma 180, com inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss. Após o estabelecimento da ascite neoplásica, os animais foram randomizados em dois grupos de 10, cada grupo composto por cinco machos e cinco fêmeas. Nos dois grupos foi realizada laparotomia e manipulação de órgãos intra-abdominais. Em um grupo a laparotomia foi realizada utilizando a proteção da ferida abdominal e no outro grupo sem proteção. No 9º dia pós-operatório foi realizada avaliação macroscópica da cicatriz operatória, sendo esta removida posteriormente para avaliação microscópica. **Resultados:** Houve infiltração microscópica de células tumorais na ferida operatória em todos animais. Porém, no grupo em que se realizou a proteção da ferida a infiltração foi menos intensa quando comparado ao grupo sem proteção. A infiltração também foi mais intensa nas fêmeas do que nos machos do mesmo grupo. **Conclusão:** A infiltração tumoral na ferida operatória foi mais intensa no grupo em que não foi realizada a proteção da ferida operatória e nas fêmeas quando comparadas aos machos do mesmo grupo.

**DESCRIPTORES** - Ascite. Sarcoma 180. Modelos animais.

**Correspondência:**  
 Rafael Coelho Caiado  
 E-mail: rafaelccaiado@gmail.com.

Fonte de financiamento: não há  
 Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 21/08/2014  
 Aceito para publicação: 09/12/2014

**HEADINGS** - Ascites. Sarcoma 180. Models, Animal.

**ABSTRACT: Background:** The number of malignancies increased alarmingly. Surgery constitutes one of the most efficient therapeutic modalities for the treatment of solid tumors. The neoplastic implant in surgical wound is a complication whose percentage of occurrence reported in the literature is variable, but sets with high morbidity and therapeutic difficulties. Protecting the wound is one of the recommended principles of oncologic surgery. **Aim:** To evaluate the influence of wound protection in the development of tumor implantation. **Methods:** Sarcoma 180 tumor cells were used, with intraperitoneal inoculation in Swiss mice. After the establishment of neoplastic ascites, animals were randomized into two groups of 10, each group consisting of five males and five females. In both groups, laparotomy and manipulation of intra-abdominal organs was performed. In a group laparotomy was performed using the protection of the abdominal wound and the other group without it. On the 9<sup>th</sup> postoperative day macroscopic evaluation of the operative scar was performed, which was later removed for microscopic evaluation. **Results:** There was microscopic infiltration of tumor cells in the wound of all animals. However, the group that held the protection, infiltration was less intense when compared to the group without it. The infiltration was also more severe in females than in males of the same group. **Conclusion:** Tumor infiltration into the wound was more intense in the group in which the protection of the surgical site was not performed, and in females when compared to males of the same group.

## INTRODUÇÃO

A cirurgia é uma das modalidades terapêuticas mais antigas no tratamento do câncer. É também a modalidade mais utilizada em todas as etapas de abordagem da doença.

No Brasil, o número de operações oncológicas no ano de 2012 foi de 86.104 e na região Centro-Oeste 5.432<sup>2</sup> e estima-se crescimento no número de de 24% até o ano de 2020<sup>4</sup>.

O implante de células neoplásicas em soluções de continuidade cirúrgicas sempre se constituiu em preocupação devido à grande morbidade que acarreta. O implante pode ocorrer em operações executadas por via de acesso convencional, ou "abertas", assim como naquelas executadas por via de acesso minimamente invasivo, que são principalmente as videolaparoscópicas, videotorascópicas, dentre outras. O implante neoplásico nos portais de acesso destas operações, também denominado por alguns

como, "port-site metastasis", tornou-se importante foco de atenção devido à crescente utilização da laparoscopia em oncologia nas últimas décadas. Para alguns autores, as incidências de implantes em portais variam entre 0,62-3,9% para carcinoma colorretal, 1-16% para carcinoma de ovário e 14-32% para câncer de vesícula biliar<sup>11,12</sup>. Port-site metastasis são definidas como lesões cancerosas recorrentes que se desenvolvem localmente na parede abdominal, no interior do tecido cicatricial em um ou mais sítios do trocarte<sup>3</sup>, podendo ocorrer de maneira semelhante em portais utilizados em locais que não o abdome.

Em estudos prévios, diversos modelos foram propostos para explicar a causa deste tipo de implante neoplásico: a implantação direta na ferida, a contaminação por instrumentos cirúrgicos, aerolização de células tumorais, efeito chaminé, a manipulação excessiva de tumor, pneumoperitônio, disseminação hematogênica, efeitos locais e sistêmicos do pneumoperitônio com dióxido de carbono, técnica cirúrgica e agressividade do tumor<sup>3</sup>. Embora a agressividade do tumor seja provavelmente o fator mais importante, a técnica cirúrgica inadequada associada à manipulação traumática do tumor são os fatores de risco sobre os quais os cirurgiões têm mais controle<sup>15</sup>.

A adequação dos modelos em animais utilizados nos estudos pré-clínicos influencia diretamente na qualidade destes estudos, assim como na correta aplicação e sucesso dos ensaios clínicos subsequentes<sup>7</sup>.

Na oncologia, atualmente, existem diversos modelos experimentais que podem auxiliar o esclarecimento desta forma de disseminação. Dentre os mais utilizados em camundongos destaca-se o Sarcoma 180 ou tumor de Crocker, tumor indiferenciado que foi encontrado em ratos albinos machos em 1914. Esse tumor foi primariamente classificado como carcinoma mamário, mas após várias transplantações subcutâneas, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram característicos de um sarcoma e passou, então, a ser chamado de Sarcoma 180<sup>14</sup>. É uma linhagem celular transplantada por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados<sup>9</sup>.

Não obstante, existem algumas condições que favorecem o uso de experimentos com tumores transplantáveis na forma ascítica, tais como a facilidade na padronização do número de células a serem inoculadas; quantificação do crescimento e regressão da massa tumoral, quando for o objetivo do estudo; possibilidade de realizar um estudo comparativo, utilizando dos mesmos métodos de pesquisa, na corrente sanguínea e nos fluidos corporais<sup>8</sup>. Para se avaliar o implante de células neoplásicas em feridas cirúrgicas, o modelo de ascite neoplásica e a simples laparotomia, com abertura e fechamento da cavidade por técnicas definidas, é modelo experimental atraente pela rapidez do desenvolvimento tumoral, simplicidade de procedimentos, causando assim, menos sofrimento ao animal participante do estudo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da proteção de ferida operatória no desenvolvimento de implante neoplásico.

## MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais descritos neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal da PUC-Goiás em conformidade com a Lei 11.794/2008 (Lei Arouca), que estabelece procedimentos para a utilização científica de animais na pesquisa e no ensino de graduação no país.

Foram utilizados 24 camundongos da raça Swiss de ambos os sexos, com idade entre 6-8 semanas e peso corporal entre 29,5-39,6 g. Os animais foram mantidos em regime alimentar com ração comercial padrão e água ad libitum, e ciclo claro-escuro de 12 h.

Na indução da ascite no modelo animal foi utilizada a linhagem tumoral do S180. As células foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Genética Molecular e Citogenética da Universidade Federal de Goiás. A linhagem celular foi mantida em dois camundongos Swiss – animais fonte – por meio de passagens sucessivas intraperitoneais na quantidade de  $2 \times 10^6$  células ajustada para volume final de 0,2 ml. Após um período de sete dias de inoculação tumoral eles foram sacrificados, o líquido da cavidade peritoneal foi aspirado, as células foram lavadas em solução salina de tampão fosfato e uma alíquota da suspensão celular foi adicionada ao corante azul de tripano 1% (m/v) (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO). A solução foi então quantificada em câmara de Neubauer e somente diluições celulares com viabilidade celular  $\geq 90\%$  foram usadas para os estudos in vivo<sup>10</sup>.

Posteriormente, todos os animais do estudo receberam via intraperitoneal em fossa ilíaca direita uma injeção com  $5 \times 10^5$  células por animal, totalizando volume igual a 0,2 ml de células do tumor S-180.

Após período de nove dias, os camundongos foram então distribuídos aleatoriamente por sorteio em dois grupos de 10, contendo cinco machos e cinco fêmeas em cada grupo. Denominou-se grupo 1, aquele que foi operado com a técnica de proteção da ferida operatória, e grupo 2, o que foi operado sem ela. Os animais de cada grupo foram subdivididos conforme segue: no grupo 1, os machos foram denominados machos com proteção de ferida (CPM) e cada animal numerado de 1 a 5, assim como nas fêmeas (CPF) do mesmo grupo; no grupo 2, utilizou-se o termo machos sem proteção de ferida (SPM) para os machos e fêmeas sem proteção de ferida (SPF) para as fêmeas, seguindo-se a numeração dos animais.

### Procedimento anestésico

Os animais foram submetidos à anestesia, conforme recomendações para o peso, utilizando os anestésicos Thiopental, cloridrato de ketamina 100 mg/ml, cloridrato de xilazina 20 mg/ml e maleato de acepromazina 10 mg/m e diluído em água estéril e utilizada solução da anestesia na dose de 125-150  $\mu\text{g}/100$  gramas de peso vivo. A anestesia foi realizada por profissional veterinário, integrante da equipe.

### Procedimento cirúrgico

Foi realizado em condições de assepsia e antisepsia adequados e a tricotomia realizada por equipamento apropriado para tricotomia.

No grupo 1, os animais foram submetidos à abertura da cavidade abdominal por incisão mediana, por planos, sendo realizada pequena incisão no peritônio, aspiração da ascite, que foi enviada para contagem de células. Após aspiração completa do líquido ascítico, a incisão foi ampliada para aproximadamente 2 cm de extensão e realizada a proteção das bordas da ferida operatória com campos secundários. No grupo 2, os animais foram submetidos à abertura da cavidade abdominal por incisão mediana, por planos, em extensão aproximada de 2 cm. Após a abertura da cavidade, em ambos os grupos foi feita manipulação dos órgãos da cavidade abdominal por 2 min e em seguida realizado o fechamento da cavidade por planos: peritônio e aponeurose, em plano único, utilizando-se chuleio simples com vycriil 3-0 e pele com chuleio simples com nylon 4-0 e curativo.

### Período de observação e variáveis de análise

Os animais foram observados mediante exame clínico diário da ferida operatória até o desenvolvimento do implante. O exame realizou-se no momento da eutanásia, utilizando-se de inspeção e palpação da superfície cutânea da ferida operatória e inspeção da superfície peritoneal.

O exame microscópico da ferida operatória foi feito mediante cortes histológicos da ferida operatória utilizando-se coloração de hematoxilina&eosina.

Posteriormente, a comprovação da presença de células neoplásicas no líquido ascítico foi realizada mediante exame citológico com colorações Papanicolau, hematoxilina&eosina e PAS.

**Procedimento de eutanásia**

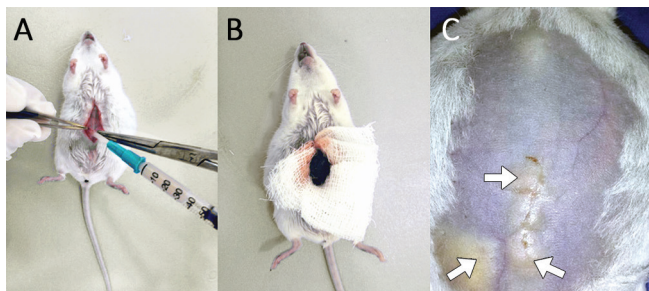
Os animais foram submetidos à anestesia, conforme descrito para o procedimento cirúrgico, e após a remoção da peça cirúrgica (ferida operatória), os animais foram levados a plano profundo mediante administração de Thiopental sódico. Posteriormente, quando percebido sinais clínicos de aprofundamento anestésico, foi então administrado, por via intra-cardíaca, solução de cloreto de potássio a 10%.

**RESULTADOS**

No início do experimento a média de peso dos animais foi de 35,28 g para os camundongos machos e 35,28 g para as fêmeas. Ao final do experimento, não houve diferença expressiva do peso em relação à proteção da ferida operatória, entretanto houve maior ganho de peso nas fêmeas em relação aos machos.

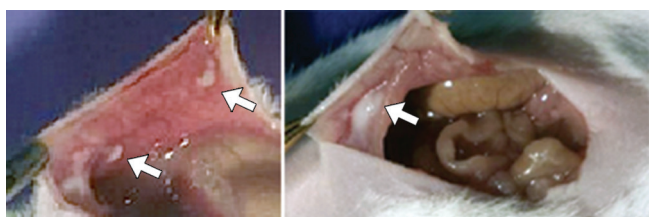
A maioria dos animais desenvolveu ascite volumosa de aspecto gelatinoso e o crescimento de células tumorais no líquido peritoneal ocorreu em 100% deles, o que foi confirmado por citologia oncótica, validando o modelo.

O procedimento cirúrgico foi realizado utilizando-se técnica de proteção da ferida operatória com gaze nas bordas, evitando-se o contato do líquido ascítico com elas, e a técnica sem proteção efetuada sem o auxílio da gaze protetora, permitindo-se o contato do líquido ascítico (Figura 1).



**FIGURA 1** - A) Abertura do peritônio seguida de aspiração do líquido ascítico; B) ferida operatória com proteção das bordas; C) cicatriz operatória com nódulos cutâneos (setas), podendo-se observar também o implante tumoral no local de inoculação inicial na fossa ilíaca direita (seta)

Após seguimento de oito dias os camundongos machos do grupo em que se realizou proteção da ferida operatória, clinicamente não apresentaram implante neoplásico na ferida operatória, ao passo que duas das quatro fêmeas o apresentaram. Uma das fêmeas deste grupo foi encontrada morta, sem causa aparente, antes do término do período de observação previsto. No grupo em que não houve proteção da ferida operatória, três dos cinco machos desenvolveram implante neoplásico na ferida, enquanto que das cinco fêmeas, quatro o apresentaram clinicamente visível (Figura 2, Tabela 1).



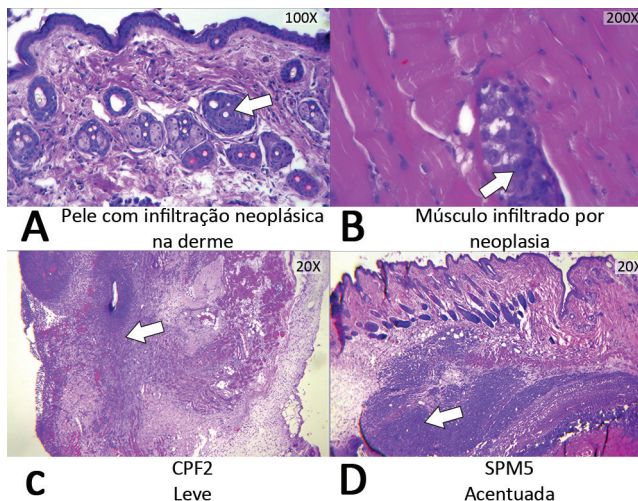
**FIGURA 2** - Nódulos peritoneais à esquerda (setas) e nódulo intramural à direita (setas)

**TABELA 1** - Avaliação macroscópica de implante neoplásico da ferida operatória, segundo a técnica operatória e com o sexo

SEXO	SEM PROTEÇÃO		COM PROTEÇÃO	
	ID	IMPLANTE	ID	IMPLANTE
FÊMEA	SPF1	SIM	CPF1	SIM
	SPF2	SIM	CPF2	SIM
	SPF3	NÃO	CPF3	NÃO
	SPF4	SIM	CPF4	NÃO
	SPF5	SIM		
MACHO	SPM1	NÃO	CPM1	NÃO
	SPM2	SIM	CPM2	NÃO
	SPM3	NÃO	CPM3	NÃO
	SPM4	SIM	CPM4	NÃO
	SPM5	SIM	CPM5	NÃO

CPM=machos numerados de 1 a 5 com proteção de ferida; CPF= fêmeas com proteção da ferida; SPM=machos sem proteção de ferida; SPF=fêmeas sem proteção de ferida

À análise microscópica, todos os animais apresentaram implante neoplásico na ferida operatória, independente do grupo. Entretanto, observou-se diferença na intensidade da infiltração neoplásica entre os grupos, sendo esta mais intensa no grupo sem proteção, seguida do grupo de fêmeas com proteção da ferida (Figura 3, Tabela 2).



**FIGURA 3** - Fotomicrografia de corte histológico de ferida operatória onde se observam em A e B as células neoplásicas infiltrando a parede abdominal (setas); em C e D a intensidade do infiltrado neoplásico (setas)

**TABELA 2** - Intensidade da infiltração neoplásica microscópica da ferida operatória, de acordo com a técnica operatória e com o sexo

SEXO	SEM PROTEÇÃO		COM PROTEÇÃO	
	ID	INTENSIDADE	ID	INTENSIDADE
FÊMEA	SPF1	+++	CPF1	+++
	SPF2	+++	CPF2	+++
	SPF3	++	CPF3	++
	SPF4	++	CPF4	++
	SPF5	+++	CPF5	
MACHO	SPM1	+++	CPM1	+++
	SPM2	++	CPM2	++
	SPM3	++	CPM3	++
	SPM4	+++	CPM4	+
	SPM5	+++	CPM5	+++

Leve: +; moderada: ++; acentuada: +++; CPM=machos numerados de 1 a 5 com proteção de ferida; CPF= fêmeas com proteção da ferida; SPM=machos sem proteção de ferida; SPF=fêmeas sem proteção de ferida

## DISCUSSÃO

O câncer é doença frequente; em 2012 ocorreram 14,1 milhões de casos novos no mundo, sendo 57% deles em regiões menos desenvolvidas<sup>16</sup>. O processo de disseminação tumoral é complexo, ocorre em múltiplas etapas e ainda não está elucidado completamente. O processo de homeostase do organismo e o equilíbrio do sistema imunológico influenciam no processo de carcinogênese e progressão tumoral, influência esta identificada desde 1863 por Rudolf Virchow<sup>5</sup>.

No presente estudo observou-se comprometimento microscópico por células tumorais na cicatriz operatória em todos os animais. No grupo em que a proteção da ferida operatória não foi realizada, este comprometimento foi intenso e ocorreu em todos os animais. De maneira surpreendente, no grupo em que se realizou a proteção da ferida, macroscopicamente apenas dois dos nove casos apresentaram suspeita de comprometimento tumoral, entretanto, microscopicamente os nove casos apresentaram infiltração de células tumorais na cicatriz operatória. Vários autores apontam possível influência de hormônios sexuais no desenvolvimento e progressão do câncer<sup>13</sup>. No presente trabalho observou-se que o comprometimento intenso da ferida operatória foi maior nas fêmeas do que nos machos, apresentando suspeita macroscópica de comprometimento em 50% dos casos em que se realizou a proteção da ferida, enquanto que no grupo de machos com proteção de ferida não houve nenhuma suspeita macroscópica de comprometimento.

Embora pouco estudado, o implante tumoral em cicatriz operatória representa alta morbidade, devendo ser evitado com medidas técnicas. O modelo tumoral ascítico é de grande utilidade para o estudo da influência da técnica operatória na prevenção e desenvolvimento do implante neoplásico. Dentre eles, o tumor de Crocker é importante modelo experimental que proporciona desenvolvimento da ascite neoplásica em sete a dez dias após a inoculação, sendo efetivo em mais de 70% dos animais. No presente estudo o estabelecimento da ascite neoplásica ocorreu em todos os animais, demonstrando a eficácia do modelo experimental. O período de avaliação deste estudo contemplou apenas a fase inicial do processo de cicatrização da ferida operatória, o que pode explicar, em parte, a presença de células tumorais em pequena intensidade no grupo em que se realizou a proteção da ferida.

Com base neste estudo não é possível concluir acerca da progressão tumoral, de forma suficiente para se estabelecer implante definitivo na cicatriz, no grupo de proteção da ferida. Neste grupo, a presença de células tumorais em pequena intensidade, não é suficiente para se concluir acerca de implante tumoral definitivo, pois o processo de cicatrização da ferida ainda não havia sido completado. Durante o processo de cicatrização o organismo busca homeostase e recomposição tecidual, utilizando-se dos diversos mecanismos celulares e humorais de defesa, podendo durante este processo ocorrer a destruição de eventuais células neoplásicas locais<sup>6</sup>. Com base neste estudo, pode-se concluir que houve infiltração mais intensa de células neoplásicas na ferida operatória no grupo em que não foi realizada a proteção da ferida em relação ao grupo em que a proteção da ferida foi realizada. De forma semelhante, a infiltração neoplásica foi mais intensa nas fêmeas do que nos machos. Acredita-se que este estudo possa contribuir para melhor compreensão do processo de invasão neoplásica em situações cirúrgicas, bem como contribuir para confirmar o estabelecimento dos princípios de cirurgia oncológica. Entretanto, para compreensão mais aprofundada e abrangente do tema, há necessidade de mais estudos contemplando diferentes fases da cicatrização e diferentes modelos tumorais.

## CONCLUSÃO

A infiltração tumoral na ferida operatória foi mais intensa no grupo em que não foi realizada a proteção da ferida operatória. Entretanto, a infiltração neoplásica microscópica ocorreu em todos os animais, independente da proteção de ferida. As fêmeas, quando comparadas aos machos do mesmo grupo, apresentaram intensidade maior da infiltração neoplásica, independente do grupo a que pertenciam.

## REFERÊNCIAS

1. Azevedo JLMC, Mattos D, Azevedo O. Descoberta simultânea de carcinomatose disseminada e carcinoma de cólon, após colecistectomia laparoscópica. *Rev Col Bras Cir*. 2000;27(4):284-286.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH-SUS). Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>. [Acessado em 10 de Jun. de 2014].
3. Chaturvedi S, Basal V, Kapoor R, Mandhani A. Is port site metastasis a result of systemic involvement? *Indian J Urol* 2012 Apr-Jun; 28(2): 169-73.
4. Devita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer: Principles and Practice of Oncology. In: Lippincott W, Wilkins. Principles of Surgical Oncology. 6th ed. Philadelphia, USA; 2008. P. 284-306.
5. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization Of The Vasculature For Treatment Of Cancer And Other Diseases. *Physiol Rev* 2011 July; 91(3): 1071-121.
6. Gupta P, Agarwal A, Gupta V, Singh PK, Pantola C, Amit S. Expression and Clinicopathological Significance of Estrogen and Progesterone Receptors in Gallbladder Cancer. *Gastrointest Cancer Res* 2012 Mar-Apr; 5(2):41-7.
7. Hossne RS. Tumor hepático experimental (VX-2) em coelho: implantação do modelo no Brasil. *Acta Cir Bras* 2002 Ago; 17(4): 208-10.
8. Nery LHR. Eficácia da dexametasona e da doxorubicina no tumor de Ehrlich transplantado em camundongos BALB/c. [Tese] Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. 2004. 71 pgs.
9. Oliveira-Jr JR, Cheschini JJ, Humanes AC, Morelli S, Silveira-Lacerda EP. Caracterização citogenética de uma linhagem celular tumoral (Sarcoma 180) de *Mus Musculus*. In: 51º Congresso Brasileiro de Genética - 2005 - São Paulo, Brasil.
10. Qi L, Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic Med Chem Letters* 2006 Aug; 16(16): 4243-5.
11. Ribeiro-Junior U, Leonardi PC, Melo GR, Pollara WM, Ceconello I. Método laparoscópico no diagnóstico e extensão da carcinomatose peritoneal. *Arq Bras Cir Dig*. 2010;23(3):196-199.
12. Santana KM, Leite RCBO. Complicações da videocirurgia para pacientes oncológicos. *Rev Bras Cancerol* 2006 Nov; 52(1): 79-86.
13. Sharma S, Eghbali M. Influence of sex differences on microRNA gene regulation in disease. *Biology of Sex Differences* [serial online]. 2014, Fev. [Acessado em 4 de Jun. de 2014]; (5)3: pp. 1-8. Disponível em: <http://www.bsd-journal.com/content/5/1/3>
14. Silva AE, Santos FGA, Cassali GD. Marcadores de proliferação celular na avaliação do crescimento do tumor sólido e ascítico de Ehrlich. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006 Ago; 58(4): 658-61.
15. Sooriakumaran P, Kommu SS, Anderson C, Rane A. Port-site metastasis after laparoscopic surgery: what causes them and what can be done to reduce their incidence? *BJU International* 2009 May; 103(9): 1150-53.
16. WHO. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2012. Disponível em: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). [Acessado em 10 de Jun. de 2014].