



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MAYARA MAIA ALVES

UTILIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA COMO NOVO MARCADOR BIOLÓGICO DO
LINFONODO SENTINELA EM RATAS WISTAR

FORTALEZA

2018

MAYARA MAIA ALVES

UTILIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA COMO NOVO MARCADOR BIOLÓGICO DO
LINFONODO SENTINELA EM RATAS WISTAR.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Bruno A. Matias da Rocha

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A1u Alves, Mayara Maia.
 Utilização da hemoglobina como novo marcador biológico do linfonodo sentinela em ratas
 Wistar. / Mayara Maia Alves. – 2018.
 245 f. : il. color.

 Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação,
 Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2018.

 Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Bruno A. Matias da
 Rocha. Coorientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Luiz
 Gonzaga Porto Pinheiro.

 1. câncer de mama. 2. linfonodo sentinela. 3. marcador biológico. I. Título.

CDD 660.6

MAYARA MAIA ALVES

UTILIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA COMO NOVO MARCADOR BIOLÓGICO DO
LINFONODO SENTINELA EM RATAS WISTAR.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 21/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Romulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ito Liberato Barroso Neto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao Apolo, meu filho, que, com seu nascimento, me fez ver a vida da forma mais sublime e pura, encorajando-me a seguir sempre em frente com dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Na realização da presente tese, contei com o apoio direto ou indireto de múltiplas pessoas e instituições às quais estou profundamente grata. Correndo o risco de injustamente não mencionar algum dos contributos, quero deixar expresso os meus agradecimentos.

A Deus, que sempre me amparou nos momentos mais difíceis, confortando-me e iluminando o meu caminho. Sem ele, nada sou.

Ao meu marido, Maurício, meu amor, que sempre me estimulou a ser melhor e mais forte. Com você, espero compartilhar muitas vitórias e conquistas! Obrigada por me dar o mais valioso presente da minha vida, o nosso filho, que se tornou nosso elo mais forte, renovando nosso amor diariamente. Feliz por ter construído esta família com você! Te amo!

À minha mãe, Angela, que me mostrou o mundo com princípios valiosos. Mãe, seu cuidado e sua dedicação foram o que me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Te amo muito, minha mãe!

À minha irmã, Michele, a quem tenho como minha filha e amo de forma incondicional. Você sempre se fez presente como uma grande amiga, apoiando-me nos momentos difíceis e sorrindo comigo nos momentos felizes. Te amo!

À minha tia, Norminha, que só tenho a agradecer, pois cuidou de mim na infância e continua tendo por mim um amor de mãe.

Ao meu afilhado Lorenzo, que nasceu para iluminar a família e nos trazer mais felicidade. A titia te ama!

À minha vizinha, Antônia, que não está mais entre nós, mas se faz presente nos seus ensinamentos. Te amo, vizinha!

Ao meu orientador, Doutor Professor Bruno Matias, todo o meu agradecimento por ter me estimulado a entrar no mundo acadêmico. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Ao co-orientador Doutor Professor Luiz Porto, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio na elaboração deste trabalho, sendo um exemplo de força, competência, caráter e inteligência, contagiando todos ao seu redor a buscar conhecimento. Só tenho a agradecer por todo apoio e pelo privilégio de trabalhar com o senhor.

Ao Professor Dr. Paulo Vasques, meus agradecimentos pelo apoio na elaboração deste trabalho e pela disponibilidade em participar da banca de defesa. Você fez parte desde o início da minha história acadêmica e sou muito grata por isso.

À Professora Dra. Daniele, reconhecida pela presteza e disponibilidade em participar da banca de qualificação e sua importante contribuição com esta tese. Muito obrigada por toda atenção dada nas correções do meu trabalho, foram pontuais e extremamente importantes no engrandecimento deste trabalho.

À Professora Dra. Márcia Pitombeira, pela disponibilidade e atenção com meu trabalho, contribuindo de forma significativa nos laudos histopatológicos.

Ao estudante de Medicina, Agostinho Pinheiro, meus agradecimentos pela disponibilidade, empenho e atenção com meu trabalho. Sua obstinação e inteligência lhe destacam entre outros estudantes, você será um grande médico!

À estudante de Biotecnologia, Dayara, meus agradecimentos pela disponibilidade e empenho. Você foi uma estudante de iniciação científica exemplar, ajudando-me em todos os momentos difíceis no decorrer destes anos.

A todos os amigos e colegas que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força que prestaram em momentos menos fáceis.

A todos os funcionários do Grupo de Educação e Estudos Oncológicos, pela disponibilidade, respeito e apoio.

RESUMO

Estudos epidemiológicos do câncer não fornecem evidências conclusivas que justifiquem a recomendação de estratégias específicas de prevenção da doença. Desta forma, os esforços para melhoria dos números relacionados ao câncer de mama são direcionados para antecipação do diagnóstico, tendo como consequências a diminuição da agressividade do tratamento administrativo e a redução da taxa de mortalidade. A biópsia do linfonodo sentinela (LS) no tratamento cirúrgico do câncer de mama com estadiamento inicial é atualmente empregada como parte do protocolo de rotina, evitando, na maioria dos casos, a linfadenectomia total. Para se tornar possível a biópsia do LS é necessária a utilização de marcadores que identifiquem o LS e facilite o ato cirúrgico. Entre os marcadores mais utilizados, estão o tecnécio e o azul patente. Os resultados das pesquisas de LS são animadores, porém, o uso dos seus marcadores possui desvantagens, como exemplo, o alto custo do tecnécio e as reações alérgicas causadas por azul patente. Durante o exame físico de duas pacientes submetidas a biópsia de mama, foi observado na pele das mesmas, o mapeamento dos vasos linfáticos com uma coloração avermelhada, em direção ao linfonodo axilar. Estudos prévios difundiram a teoria que um derivado de sangue (hemossiderina) foi capturado por macrófagos e acessado no ducto linfático em direção à axila. Na tentativa de replicar o que foi visto em pacientes, foi desenvolvido um protocolo experimental para a obtenção de um marcador derivado do sangue e testado em um modelo de cirurgia experimental em cães onde afirmou-se a existência de um novo marcador autólogo do sangue. Após vários estudos preliminares, foram realizadas aplicações em pacientes com câncer de mama no Hospital Maternidade de Fortaleza, sendo reconhecido o sucesso em todos os procedimentos de aplicação da “hemossiderina”. No entanto, a hipótese de que o marcador derivado do sangue seria a hemossiderina surgiu somente dos dados clínicos e de pesquisas científicas preliminares, assim, a afirmação possui suas discordâncias. Para tanto, este projeto avaliou as características do hemoderivado (hemossiderina), ao qual foi identificado como a principal substância responsável pela marcação do LS. Foi realizado um aperfeiçoamento do marcador biológico isolado avaliando seus efeitos nos ensaios pré-clínicos em ratas wistar através da purificação da substância responsável pela marcação e da padronização do seu tempo de drenagem, doseamento, concentração de metahemoglobina, e como as enzimas proteolíticas e a temperatura poderiam

interferir sobre a marcação tecidual do LS. Após estudo, observou-se que a hemoglobina é a principal responsável pela marcação do LS e este processo de marcação pode ser otimizado através da padronização das condições homeostáticas do marcador biológico, aplicando-se ao concentrado de hemoglobina: nitrito a 3% por 48h e inibidores de proteases, respeitando o tempo de drenagem de 2h e mantendo a temperatura da amostra a 25°C.

Palavras-chave: Câncer de mama. Linfonodo sentinela. Marcador biológico.

ABSTRACT

Epidemiological studies do not provide conclusive evidence justifying the recommendation of specific prevention strategies. Thus, efforts to improve the numbers related to breast cancer are directed towards the early diagnosis, resulting in a decrease of administrative treatment aggressiveness and a mortality rate reduction. Sentinel lymph node (SLN) biopsy, in breast cancer surgical treatment as initial staging, has been currently employed as part of the routine protocol, avoiding in most cases the total lymphadenectomy. To make it possible to do SLN biopsy, it is necessary to use markers that identify the SLN and facilitate the surgical procedure. Among the most used markers are Technetium and Blue patent. The results of sentinel lymph node research are encouraging. However, the use of its markers has disadvantages, such as the high cost of technetium and allergic reactions caused by patent blue. During the physical examination of two patients submitted to breast biopsy, it was observed, in their skin, the mapping of the lymphatic vessels with a reddish coloration, towards the axillary lymph node. Previous studies have disseminated the theory that a blood derivative (Hemosiderin) can be captured by macrophages and accessed in the lymphatic duct towards the armpit. In an attempt to replicate what was seen in patients, an experimental protocol was developed to obtain a blood-derived marker and was tested in a dogs model of experimental surgery, where was proved the existence of a new autologous blood marker. After several preliminary studies, procedures were performed in patients with breast cancer at Hospital Maternidade Escola Assis Chateaubriand, localized in Fortaleza-CE. These procedures with Hemosiderin were a success. However, the hypothesis that the blood-derived marker was hemosiderin emerged only from clinical data and preliminary scientific research, so this assertion has its discord. This project studied the characteristics of the blood derived (Hemosiderin), leading to clarification of the main substance responsible for SLN marking and isolated biological marker improvement. It was analyzed in parallel with Pre-clinical studies in wistar rats, by purifying the substance responsible for marking and standardizing its drainage time, dosing, methemoglobin concentration, and how the proteolytic enzymes and temperature could interfere with. After study, it was observed that hemoglobin is the main responsible for SLN marking. This marking process could be optimized by standardizing the biological marker homeostatic conditions, applying to the hemoglobin

concentrate 3% nitrite for 48 h and protease inhibitors, respecting the 2h drainage time and maintaining the sample temperature at 25 °C.

Keywords: Breast cancer. Sentinel lymph node. Biological marker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia mamária mostrada em uma secção sagital.....	24
Figura 2 – Esquema de um carcinoma ductal in situ em uma secção sagital da glândula mamária	27
Figura 3 – Esquema de um carcinoma lobular in situ em uma secção sagital da glândula mamária	28
Figura 4 – Classificação de acordo com características do tumor primário ..	33
Figura 5 – Classificação de acordo com a extensão do cancro ao nível dos gânglios linfáticos regionais	34
Figura 6 – Metástases à distância	35
Figura 7 – Anatomia do linfonodo	44
Figura 8 – Drenagem linfática da mama humana	47
Figura 9 – A) Linfocintilografia de mama e B) Marcação cutânea.....	50
Figura 10 – Coloração após administração do corante azul	54
Figura 11 – Presença de numerosas placas no membro inferior após aplicação do corante Azul Patente	55
Figura 12 – Pele de paciente no pós-operatório de biópsia de nódulo mamário marcada com derivado de sangue, desenhando o ducto linfático principal da papila em direção a axila.....	58
Figura 13 – Avaliação macroscópica de LS em modelo experimental canino	59
Figura 14 – Fluxograma de obtenção do pool de proteínas (extrato total) derivadas do concentrado de hemácias	64
Figura 15 – Fluxograma da estratégia experimental.....	67
Figura 16 – Esquema experimental em animal.....	71
Figura 17 – Fluxograma do experimento animal para padronização do tempo de drenagem. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; [Hb], concentrado de hemoglobina.....	72
Figura 18 – Fluxograma do experimento animal para padronização da concentração do [Hb]. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; [Hb], concentrado de hemoglobina	73

Figura 19 – Fluxograma do experimento animal para avaliar a relação da marcação tecidual do linfonodo sentinela com diferentes concentrações de metahemoglobina. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; Hb, hemoglobina	74
Figura 20 – Fluxograma do experimento animal para avaliar a relação da marcação tecidual do linfonodo sentinela após proteólise do concentrado de hemoglobina. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; Hb, hemoglobina	75
Figura 21 – Fluxograma do experimento animal para avaliar a marcação tecidual do linfonodo sentinela após ensaio de termoestabilidade do marcador biológico. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; Hb, hemoglobina	76
Figura 22 – Aspecto macroscópico da cor dos linfonodos.....	78
Figura 23 – Classificação microscópica dos experimentos em animais	79
Figura 24 – Micrografias óticas.....	80
Figura 25 – Micrografias das células vermelhas antes da hemólise, para avaliação do número de leucócitos antes (A) e após (B) as lavagens com centrifugação	84
Figura 26 – Micrografias das células vermelhas após as lavagens (A) e do hemolisado obtido com água bidestilada (B)	85
Figura 27 – Mapa proteômico do extrato total	86
Figura 28 – (A) Gráfico da Cromatografia e (B) Perfil eletroforético	87
Figura 29 – Gráfico da cromatografia de troca catiônica em matriz de celulose	88
Figura 30 – Perfil eletroforético e alíquotas acumuladas.....	89
Figura 31 – Ensaio in vivo do tempo de drenagem para linfonodo sentinela da região poplíteia	91
Figura 32 – Ensaio in vivo com intuito de avaliar a concentração padrão para marcação tecidual do linfonodo da região poplíteia.....	93
Figura 33 – Perfil proteico das seguintes enzimas: pepsina (A); papaína (B) e tripsina (C)	95

Figura 34 – Ensaio in vivo utilizando o concentrado de Hb após proteólise como o marcador tecidual.....	97
Figura 35 – Ensaios in vivo com intuito de avaliar a termoestabilidade padrão para marcação tecidual do linfonodo da região poplítea	98
Figura 36 – Ensaios in vivo com intuito de avaliar a concentração de metahemoglobina ideal para uma coloração efetiva do linfonodo sentinela da região poplítea.....	102
Figura 37 – Imagens com microscopia confocal da presença de fagossomos contendo concentrado de Hb.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	23
Quadro 2 – Tipos de cirurgias no tratamento do câncer de mama.....	37
Quadro 3 – Fármacos sistêmicos mais comuns para o câncer de mama.....	40
Quadro 4 – Parâmetros aceitáveis de obtenção do extrato total.....	65
Quadro 5 – Classificação da marcação tecidual de acordo com o número de macrófagos com a presença granulações nas lâminas histopatológicas do tecido linfoide.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração de metahemoglobina e hemoglobina, por tempo de contato do Nitrito com o concentrado de hemoglobina.....	81
Tabela 2 –	Estágios do hematoma na ressonância magnética.....	114

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Relevância estatística do número de macrófagos.....	92
Gráfico 2 – Relevância estatística do número de macrófagos.....	94
Gráfico 3 – Relevância estatística do número de macrófagos.....	99
Gráfico 4 – Gráfico demonstrativo da relação entre concentração de hemoglobina e metahemoglobina, após o contato do concentrado de Hb com Nitrito a 3%.....	101
Gráfico 5 – Relevância estatística do número de macrófagos.....	103
Gráfico 6 – Relevância estatística do maior número de macrófagos com vestígios do concentrado de hemoglobina com nitrito.....	104

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Hb]	Concentrado de Hemoglobina
[MetaHb]	Concentrado de Metahemoglobina
AC	Citrato trisódico-ácido cítrico
ACD	Ácido Cítrico / Citrato sódico / Dextrano
AX	Linfonodos axilares
BLS	Biópsia do Linfonodo Sentinela
CDI	Carcinoma ductal invasor
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC
CH	Concentrado de Hemácias Lavadas
CHL	Concentrado de hemácias lavadas após lise
CLI	Carcinoma lobular invasor
CLIS	Carcinoma lobular in situ
CM	Câncer de Mama
CM	Carboximetilcelulose
CP	Controle Positivo
DMSO	Dimetilsulfúrico
DO	Densidade Óptica
EA	Esvaziamento Axilar
ECM	Exame Clínico das Mamas
EPC	Estadiamento Prognóstico Clínico
EPP	Estadiamento Prognóstico Patológico
ET	Extrato Total
Hb	Hemoglobina
Hbe	Hemoglobina extracelular
HE	hematoxilina-eosina
HEMOCE	Hemocentro do Ceará
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidérmico
Ht	Hematócrito
IEF	Focalização isoelétrica
ILIN	Linfonodo inguinal

INCA	Instituto Nacional do Câncer
LC	Linfocintilografia
LS	Linfonodo Sentinela
MetaHb	Metahemoglobina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
pl	Ponto Isoelétrico
PO	Linfonodo poplíteo
RE	Linfonodo renal
RE	Receptor de Estrogênio
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Receptor de Progesterona
SBF	Soro Bovino Fetal
TC 99m	Tecnécio
TNM	Tumor Nodes Metastases
UFC	Universidade Federal do Ceará
VL	Vasos Linfáticos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Incidência do câncer de mama.....	22
1.2	Anatomofisiopatologia.....	23
1.2.1	<i>Receptores hormonais e fator de crescimento epidérmico.....</i>	25
1.2.1.1	<i>Receptores hormonais (RE, RP)</i>	25
1.2.1.2	<i>Receptor do fator de crescimento epidérmico (HER-2)</i>	26
1.2.2	<i>Tipos mais frequentes do câncer de mama.....</i>	26
1.2.2.1	<i>Carcinoma ductal in situ.....</i>	26
1.2.2.2	<i>Carcinoma ductal invasor.....</i>	27
1.2.2.3	<i>Carcinoma lobular in situ.....</i>	27
1.2.2.4	<i>Carcinoma lobular invasor.....</i>	28
1.3	Diagnóstico.....	29
1.4	Fatores prognósticos.....	31
1.4.1	<i>Estadiamento.....</i>	31
1.4.1.1	<i>Estadiamento anatômico.....</i>	32
1.4.1.2	<i>Estadiamento prognóstico clínico.....</i>	35
1.4.1.3	<i>Estadiamento prognóstico patológico.....</i>	36
1.5	Tratamento.....	36
1.5.1	<i>Tratamento local.....</i>	36
1.5.1.1	<i>Cirurgia.....</i>	36
1.5.1.2	<i>Radioterapia.....</i>	38
1.5.2	<i>Tratamento sistêmico.....</i>	39
1.5.2.1	<i>Terapia biológica.....</i>	39
1.5.2.2	<i>Quimioterapia.....</i>	40
2	TRATAMENTO CIRÚRGICO COM ABORDAGEM AXILAR NO CÂNCER DE MAMA.....	42
2.1	Linfonodos no câncer de mama.....	43
2.1.1	<i>Os linfonodos e o sistema linfático.....</i>	43
2.1.2	<i>Linfonodo sentinela no câncer de mama.....</i>	45
2.2	Biópsia do linfonodo sentinela.....	48
2.2.1	<i>Protocolo da técnica de biópsia do linfonodo sentinela.....</i>	50

2.2.1.1	<i>Pré-operatório: linfocintilografia</i>	50
2.2.1.2	<i>Técnica cirúrgica</i>	51
2.2.1.3	<i>Análise citológica e histopatológica</i>	52
2.3	Marcadores do linfonodo sentinela	52
2.3.1	<i>Corantes vitais</i>	53
2.3.2	<i>Radiofármacos</i>	55
2.3.3	<i>Técnicas combinadas</i>	56
2.4	Novo marcador autólogo do sangue (hemossiderina)	57
2.4.1	<i>Protocolo para utilização da hemossiderina</i>	58
2.5	Marcador tecidual hemossiderina?	60
3	OBJETIVOS	62
3.1	Objetivo geral	62
3.2	Objetivos específicos	62
4	METODOLOGIA	63
4.1	Obtenção do concentrado de hemácias hemolisadas	63
4.1.1	<i>Controle de qualidade do extrato total</i>	64
4.2	Quantificação de proteínas nas frações obtidas das etapas de purificação	65
4.3	Purificação: cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-100	66
4.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	66
4.5	Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)	68
4.6	Eletroforese bidimensional	68
4.6.1	<i>Focalização isoeétrica (primeira dimensão)</i>	68
4.6.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i>	69
4.6.3	<i>Detecção das proteínas em géis bidimensionais e análise de imagem</i>	69
4.7	Determinação da concentração de metahemoglobina (MetaHb)	69
4.8	Aplicações biológicas de moléculas	70
4.8.1	<i>Modelo experimental em animal</i>	70
4.8.2	<i>Determinação do tempo de drenagem do marcador biológico</i> ..	72
4.8.3	<i>Determinação da concentração padrão do marcador biológico</i>	73

4.8.4	Ensaio para avaliar a relação da marcação tecidual do linfonodo poplíteo com a concentração de metahemoglobina	73
4.8.5	Ensaio para avaliar a marcação tecidual do linfonodo sentinela após proteólise do marcador biológico.....	74
4.8.6	Ensaio para avaliar a marcação tecidual do linfonodo sentinela após ensaio de termoestabilidade do marcador biológico.....	76
4.9	Microscopia.....	77
4.9.1	Microscopia óptica.....	77
4.9.1.1	<i>Classificação macroscópica e microscópica.....</i>	77
4.9.1.1	<i>Análise estatística.....</i>	81
4.9.2	Microscopia confocal.....	82
4.9.2.1	<i>Cultura de macrófagos.....</i>	82
4.9.2.2	<i>Análise em microscópio confocal.....</i>	83
5	RESULTADOS.....	84
5.1	Padronização da obtenção do extrato total.....	84
5.2	Purificação.....	86
5.2.1	Cromatografia de exclusão em Sephadex G-100.....	86
5.2.2	Cromatografia de troca catiônica no Akta Purifier.....	88
5.3	Aplicações de marcador biológico in vivo.....	90
5.3.1	Modelo experimental em animal.....	90
5.3.2	Determinação do tempo de drenagem no linfonodo sentinela...	90
5.3.3	Determinação da concentração padrão para marcação tecidual do linfonodo sentinela.....	92
5.3.4	Atividade da fração isolada após proteólise.....	94
5.3.5	Ensaio de termoestabilidade do marcador biológico.....	97
5.3.6	Ensaio para obtenção de metahemoglobina em diferentes concentrações e a sua relação com a marcação tecidual do linfonodo sentinela.....	100
5.4	Microscopia confocal.....	104
6	DISCUSSÃO.....	107
6.1	Padronização da obtenção do extrato total (concentrado de hemácias hemolisadas).....	108

6.2	Purificação da hemoglobina.....	109
6.3	Aplicações de marcador biológico in vivo.....	112
6.4	Atividade da fração isolada após proteólise.....	112
6.5	Ensaio de termoestabilidade.....	113
6.6	Ensaio para obtenção de metahemoglobina em diferentes concentrações e a sua relação com a marcação tecidual do linfonodo sentinela.....	114
6.7	Microscopia confocal.....	116
6.8	Importância de um novo marcador otimizado.....	117
7	CONCLUSÃO.....	120
	REFERÊNCIAS.....	121
	APÊNDICE A – ORIGINAL ARTICLE “COMPARISON BETWEEN HEMOSIDERIN AND TECHNETIUM-99 IN SENTINEL LYMPH NOPE BIOPSY IN HUMAN BREAST CANCER”	139
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL “IDENTIFICAÇÃO DO LINFONODO SENTINELA UTILIZANDO HEMOSSIDERINA EM CASOS DE CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO”...	145
	APÊNDICE C – ORIGINAL ARTICLE “ASEPTIC AND OPTIMIZED PREPARATION OF HUMAN BLOOD DERIVED FOR LYMPH NODE IDENTIFICATION IN WOMAN BREAST: TRANSOPERATORY CONTROL WITH TECHNETIUM”.....	152
	APÊNDICE D – ORIGINAL ARTICLE “BLOOD-DERIVED MARKER FOR BREAST CANCER SENTINEL LYMPH NODE IDENTIFICATION: A HISTOPATHOLOGIC AND BIOCHEMICAL STUDY IN RATS”	182
	ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO TNM.....	205
	ANEXO B – FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO.....	214

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incidência do câncer de mama

O câncer ocupa posição de destaque nos estudos referentes à saúde devido à magnitude epidemiológica, social e econômica, evidenciando-se como problema de saúde pública (FELDEN; FIGUEIREDO, 2011; YOSHINARI *et al*, 2017). Considerando que nos países desenvolvidos predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimentos ainda permanecem a alta ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado) (FERLAY *et al.*, 2013). Pesquisas do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) indicam que no Brasil, biênio 2018-2019, haverá ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, para cada ano, representando uma maior incidência para cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto (Quadro 1) (INCA, 2018).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), o câncer de mama (CM) é o mais comum entre as mulheres, sendo a segunda principal causa de morte (ONU, 2016). As taxas de incidência variam quase quatro vezes em todas as regiões do mundo, podendo variar de 27 a cada 100 mil mulheres na África Central e Ásia Oriental, e de 92 a cada 100 mil mulheres na América do Norte (WHO, 2012; INCA, 2018). Na maioria das regiões do mundo há uma tendência no aumento nas taxas de incidência. Contudo, nos países mais desenvolvidos, a incidência atingiu uma estabilidade seguida de redução na última década, apresentando um declínio nas taxas de mortalidade desde o final da década de 1980 e início de 1990. Esse declínio na incidência reflete uma combinação da melhoria na detecção precoce, por meio de rastreamento populacional e intervenções terapêuticas mais eficazes (STEWART; WILD, 2014).

Pesquisas recentes indicam que para cada ano do biênio 2018-2019, são esperados 59.700 casos novos de CM no Brasil (Quadro 1), com um risco estimado de aumento de 56,33 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). Na última década, a mortalidade por esse tipo de câncer aumentou nas cinco macrorregiões brasileiras, onde as taxas têm apresentado variações geográficas em estudos nacionais, região Sudeste (2,94%), região Sul (3,21%), região Nordeste (2,31%), Centro-Oeste (2,97%)

e Norte (2,19%) (INCA, 2015). Na região Nordeste, foram estimados 11.860 novos casos de câncer, sendo o CM mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 40,46 casos novos por 100 mil, tendo Fortaleza uma taxa superior à média da região de 71,02 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). As desigualdades regionais estão provavelmente associadas ao(s): índice de desenvolvimento humano, índice de exclusão social, taxas de cobertura mamográfica, acesso aos serviços de saúde e a qualidade do tratamento oncológico (FREITA et al. 2012, 2013; KLUTHOCOVSKY et al., 2014).

Quadro 1 - Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma

HOMENS		MULHERES	
Localização primária	Novos Casos	Localização primária	Novos Casos
Próstata	68.220	Mama feminina	59.700
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	Cólon e Reto	18.980
Cólon e Reto	17.380	Colo do Útero	16.370
Estômago	13.540	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530
Cavidade Oral	11.200	Glândula Tireoide	8.040
Esôfago	8.240	Estômago	7.750
Bexiga	6.690	Corpo do Útero	6.600
Laringe	6.390	Ovário	6.150
Leucemias	5.940	Sistema Nervoso Central	5.510
Sistema Nervoso Central	5.810	Leucemias	4.860

Fonte: Instituto Nacional de câncer, 2018.

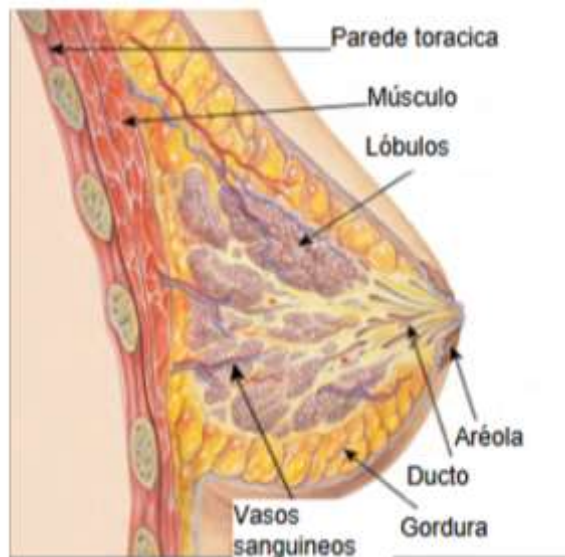
1.2 Anatomofisiopatologia

As mamas são órgãos pares, situados na parede anterior do tórax, sobre os músculos grandes peitorais. Cada mama apresenta uma aréola e uma papila, na sua região central. Na papila mamária exteriorizam-se 15 a 20 orifícios ductais, que correspondem às vias de drenagem das unidades funcionantes, que são os lobos mamários, estes são separados por tecido fibroso, de forma que cada um tem a sua via de drenagem, que converge para a papila, através do sistema ductal (Figura 1). A mama apresenta vasos sanguíneos e linfáticos, sendo o sangue responsável pela

remoção dos detritos celulares do tecido mamário e a linfa por transportar proteínas e fornecer proteção imunológica (INCA, 2002; NCCN, 2017).

As mulheres mais jovens apresentam mamas com maior quantidade de tecido glandular, ao se aproximar da menopausa, o tecido mamário vai sendo substituído progressivamente por tecido gorduroso, até se constituir, quase que exclusivamente, de gordura e resquícios de tecido glandular na fase pós-menopausa (INCA, 2002).

Figura 1 – Anatomia mamária mostrada em uma secção sagital



Fonte: NCCN, 2011.

Figura 1: o lóbulo mamário (unidade funcional mamária, onde se situa células responsáveis pela produção do leite); ducto lactífero (sistema de canais que conduz o leite até a papila); aréola (estrutura central da mama onde se projetam as fibras musculares elásticas onde desembocam os ductos lactíferos); gordura (tecido adiposo que ocupa todo o restante da mama).

O período crítico de oncogênese para o câncer de mama parece corresponder ao intervalo entre a menarca e a primeira gestação a termo, pois é nesse momento que o lóbulo mamário se encontra em amplo processo de divisão celular (BERGMANN, 2000; NCCN, 2011). Sabe-se que células em intensa divisão celular estão mais susceptíveis a mutações e, conseqüentemente, transformações malignas.

Tendo ocorrido esse processo, o desenvolvimento do câncer se dará de forma lenta, podendo levar aproximadamente 10 anos para se tornar um tumor de 1 cm, quando então é possível a palpação, evidenciando a importância do rastreamento (INCA, 2002). Geralmente, os tumores costumam ter início nos ductos e lóbulos mamários, onde algumas células neoplásicas podem migrar para os gânglios linfáticos e posteriormente para outros tecidos (NCCN, 2017).

O câncer de mama tem origem numa disfunção celular, que se caracteriza por processo de multiplicação e crescimento desordenado das células epiteliais. A velocidade no crescimento do tumor depende de diversos fatores, principalmente hormonais, como a ação do estrogênio e da progesterona (RICCI, 2008).

1.2.1 Receptores hormonais e fator de crescimento epidérmico

1.2.1.1 Receptores hormonais (RE, RP)

O estrogênio e a progesterona são hormônios que estimulam o crescimento da mama durante a puberdade (NCCN, 2011). Em alguns tipos de tumor, esses hormônios também estimulam o crescimento do próprio tumor, sendo chamados de tumores com receptores de estrogênio (RE) positivos, receptores de progesterona (RP) positivos ou com ambos receptores positivos. Estes tumores possuem como principais características o crescimento mais lento, menor probabilidade de disseminação para os gânglios linfáticos e possibilidade de uso da hormonioterapia. (NCCN, 2017).

Tumores RE-positivos utilizam o esteroide hormonal estradiol como seu principal estímulo para crescimento. RE é, portanto, o alvo direto das terapias hormonais, onde o tratamento com tamoxifeno reduz a taxa anual de morte por CM em 31% na doença de RE-positivo (BUIRAGO, UEMURA e SENA, 2011). A expressão do RP está diretamente dependente da presença de RE (VIALE et al., 2007). Tumores que expressam tanto para RE e RP, apresentam melhor resposta ao tratamento anti-estrogênico em pacientes com câncer de mama metastáticos, quando comparado com pacientes que apresentam positividade somente para RE e falta expressão para RP (BUIRAGO, UEMURA e SENA, 2011; NARDI, 2017).

1.2.1.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico (HER-2)

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) constitui-se como um dos principais receptores no CM. A sua expressão é associada a maior agressividade biológica do tumor e a resistência a alguns tipos de tratamento, pois o HER-2 codifica uma proteína de membrana das células tumorais responsável pelo maior crescimento e divisão das células tumorais (NCCN, 2011).

A presença do HER-2 está diretamente relacionada ao maior risco de recidiva tumoral e possui um papel importante na transformação oncológica. Amplificação do HER-2 ou superexpressão são reconhecidos como importantes marcadores de doença agressiva e são os alvos moleculares para terapias específicas, como trastuzumab e lapatinib (BUIRAGO, UEMURA e SENA, 2011; NCCN, 2011).

1.2.2 Tipos mais frequentes do câncer de mama

Os tumores malignos próprios da mama, isto é, os adenocarcinomas, são divididos em *in situ* e invasores e estes dois subgrupos, por sua vez, são divididos em ductais e lobulares. Cada um destes subgrupos tem seus subtipos, cada qual com suas características histopatológicas próprias que influenciam o comportamento clínico (ELISENBERG e KOIFMAN, 2000). Existem também outros tipos menos comuns de câncer de mama, como sarcomas, filóides, doença de Paget e angiossarcomas que se iniciam nas células do músculo, gordura ou tecido conjuntivo (ACS, 2017).

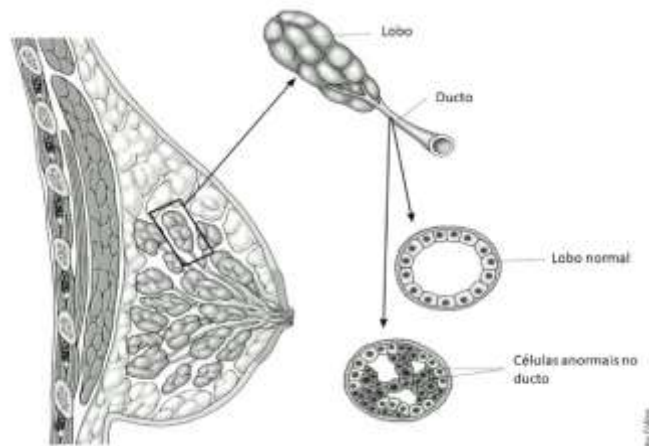
O principal objetivo na identificação dos variados tipos de carcinomas invasores da mama é permitir a previsibilidade do comportamento do tumor e a resposta ao tratamento (BARROSO e METZGER, 2016; FUHRMAN e KING, 2013).

1.2.2.1 Carcinoma ductal *in situ*

O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (Figura 02), é considerado um câncer não invasivo ou pré-invasivo (ACS, 2016). Os carcinomas não invasivos representam aproximadamente 15% dos cânceres de mama, com o carcinoma ductal *in situ* em 80% dos casos e o carcinoma lobular *in situ* em 20% dos casos (BOXER, DELANEY

e CHUA, 2013). Por definição, o CDIS é a proliferação de células neoplásicas, limitada ao epitélio ductal sem invasão da membrana basal e do estroma, conferindo um bom prognóstico, pois ainda não apresenta potencial metastático. (SHAH et al., 2012; WILKE et al., 2006).

Figura 2 – Esquema de um carcinoma ductal *in situ* em uma secção sagital da glândula mamária



Fonte: ACS, 2016.

1.2.2.2 Carcinoma ductal invasor

Dentre os subtipos histológicos, o carcinoma ductal invasor (CDI) é o tipo mais comum de câncer de mama invasivo, correspondendo a 70 a 80% dos casos. O crescimento neoplásico ultrapassa a membrana basal devido à desdiferenciação celular, permitindo a invasão do parênquima mamário. Nesse ponto, ele pode se metastatizar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da corrente sanguínea. O CDI caracteriza-se por uma massa palpável detectável clinicamente, além da densidade radiológica e ecográfica típicas de carcinomas invasivos (LAZARETTI et al., 2016; ACS, 2017).

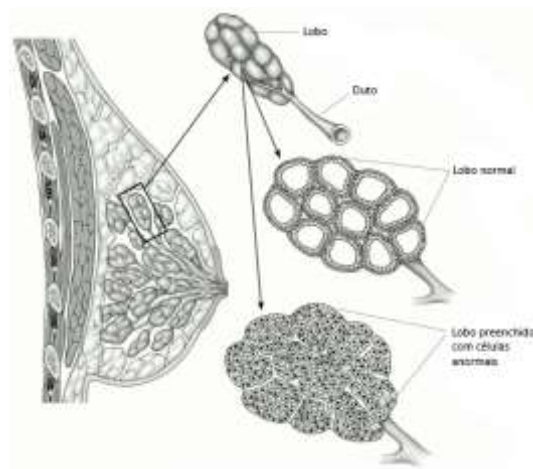
1.2.2.3 Carcinoma lobular *in situ*

O carcinoma lobular *in situ* (CLIS) (Figura 3) é classificado como câncer de mama não invasivo, entretanto, as mulheres com esta neoplasia possuem predisposição ao desenvolvimento de câncer de mama invasivo. O CLIS possui maior

taxa de incidência em mulheres com idade entre 40-50 anos (RIBEIRO, 2014; STOPECK, 2014).

Esse tipo de neoplasia desenvolve-se nos lóbulos da mama. O CLIS geralmente não requer tratamento, mas aumenta o risco de uma mulher desenvolver câncer em ambos os seios (ACS, 2016).

Figura 3 - Esquema de um carcinoma lobular *in situ* em uma secção sagital da glândula mamária



Fonte: ACS, 2016.

1.2.2.4 Carcinoma lobular invasor

O segundo tipo de CM com maior incidência é o carcinoma lobular invasivo (CLI), que abrange 5 a 10% das lesões invasivas, alguns carcinomas lobulares infiltrantes apresentam aspecto macroscópico idêntico ao de carcinoma ductal infiltrante, em muitos casos, sem lesão de massa evidente, e o tecido mamário retirado pode ter uma consistência normal ou apenas ligeiramente firme (LAZARETTI et al., 2016).

O carcinoma lobular invasivo inicia-se nas unidades funcionais da mama, podendo metastatizar para outras partes do corpo. O carcinoma lobular invasivo pode ser mais difícil de ser detectado no exame físico, assim como na mamografia, do que no carcinoma ductal invasivo (ACS, 2017).

1.3 Diagnóstico

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças, com comportamentos complexos e distintos. A diversidade desse câncer pode ser observada pelas variadas manifestações clínicas e morfológicas, diferentes assinaturas genéticas e consequentes diferenças nas respostas terapêuticas (INCA, 2017). Embora tenham sido identificados alguns fatores ambientais ou comportamentais associados a um risco aumentado de desenvolver o CM, estudos epidemiológicos não fornecem evidências conclusivas que justifiquem a recomendação de estratégias específicas de prevenção (MINISTERIO DA SAÚDE, 2004). Desta forma, os esforços para melhoria dos números relacionados ao câncer de mama são direcionados para antecipação do diagnóstico, tendo como consequências: diminuição da agressividade do tratamento e redução da taxa de mortalidade (MOLINA *et al.*, 2003).

Tem-se observado em alguns países desenvolvidos, como é o caso dos Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Holanda, Dinamarca e Noruega, um aumento da incidência seguido de uma diminuição da mortalidade por câncer de mama, o que está diretamente relacionado à detecção precoce por meio da introdução da mamografia para rastreamento e à oferta de tratamento adequado. No Brasil, o aumento da incidência tem sido acompanhado do aumento da morbimortalidade, o que pode ser atribuído, principalmente, a um atraso do diagnóstico e do emprego da terapia inadequada (MINISTERIO DA SAÚDE, 2004). Quando comparadas de acordo com a extensão das neoplasias malignas, as mulheres brasileiras são diagnosticadas em estágios avançados, enquanto que em países desenvolvidos geralmente as mulheres recebem o diagnóstico do CM no início da doença (INCA, 2009, MIGOWSKI *et al.*, 2018).

Tendo em vista que as taxas de sobrevivência são altas quando seguidas de um diagnóstico e tratamento do câncer de mama em seu estágio inicial, houve um direcionamento de esforços na investigação por maior sensibilidade e especificidade na detecção de tumores iniciais, incentivando-se a realização de estudos estratégicos que pautassem os programas de detecção precoce da doença (MENKE *et al.*, 2007; MIGOWSKI *et al.*, 2018).

Os programas de rastreamento e detecção precoce do câncer de mama, em sua maioria apoiam-se no exame clínico das mamas (ECM) e mamografia,

possuindo como objetivos a redução das taxas de mortalidade pela doença e o diagnóstico precoce, assim, conseqüentemente o aumento de mais opções terapêuticas, com menores efeitos indesejados nos âmbitos físico, mental e social (BATISTON *et al.*, 2009; GONÇALVES *et al.*, 2009; AGUILLAR *et al.*, 2012; MIGOWSKI *et al.*, 2018).

O ECM deve ser realizado anualmente por um profissional de saúde habilitado, de forma sistematizada. Na etapa de inspeção, são observados os principais sinais do CM: cor do tecido mamário, erupções cutâneas ou descamação, evidência de pele em “casca de laranja”, além de proeminências venosas, massas visíveis, retrações ou pequenas depressões, além de serem examinados os linfonodos das cadeias axilares, supra e infra claviculares, devendo ser observado o número de linfonodos palpados, bem como seu tamanho, consistência e mobilidade. Após a palpação linfonodal, deve-se realizar a ordenha mamária a fim de verificar a presença de secreção. Ao fim do exame, o profissional deve relatar a presença de alterações, como nódulos, adensamentos, secreções mamilares ou areolares, entre outras (FOGAÇA; GARROTE, 2004; BRASIL, 2004; CARMICHAEL *et al.*, 2004; MIGOWSKI *et al.*, 2018).

A mamografia é o método de escolha para o rastreamento populacional do câncer de mama em mulheres assintomáticas, sendo a principal facilitadora do diagnóstico de distintas alterações não palpáveis e identificação de alterações sugestivas de malignidade (CARMICHAEL *et al.*, 2004; THULER, 2003; CHALA E BARROS, 2007; BRASIL, 2004). A mamografia é realizada em aparelho de raios X apropriado, chamado mamógrafo, no qual são realizadas, através de compressão, duas incidências de cada mama, uma crânio-caudal e outra médio-lateral oblíqua, sendo possível visualizar com precisão os nódulos, as microcalcificações e as densidades assimétricas focais ou difusas, além de distorções parenquimatosas, dilatação ductal, espessamento cutâneo, retração da pele e/ou complexo aréolo-papilar e linfadenopatia axilar (CHALA e BARROS, 2007; CALDAS *et al.*, 2005).

A Sociedade Brasileira de Mastologia prevê uma mamografia anual desde os 40 anos e a *American Cancer Society* preconiza mamografia anual iniciando aos 45 anos e bienal aos 55 anos (ACS, 2016; AGUILLAR, 2012). O programa de rastreamento do Ministério da Saúde do Brasil preconiza o Exame Clínico das Mamas feito uma vez por ano pelas mulheres a partir de 40 anos e a mamografia realizada a cada dois anos pelas mulheres de 50 a 69 anos, ou segundo recomendação médica

(INCA, 2014). Em mulheres com histórico familiar de câncer de mama, o rastreamento anual com ressonância nuclear magnética (RNM), além de mamografia, é recomendado, normalmente desde a idade de 30 anos (ACS, 2013). Entretanto, o alto custo da RNM impossibilita tal aplicação (NASCIMENTO, PITTA e RÊGO, 2015).

1.4 Fatores prognósticos

Dentre os principais indicadores para o prognóstico do CM estão o tamanho do tumor e a condição dos linfonodos axilares (SOERJOMATARAM et al., 2008; RAKHA e ELLIS, 2011; NCCN, 2017), tanto que se constituem a base do estadiamento estabelecido e determinado pela União Internacional Contra o Câncer (CARTER; ALLEN; HENSON, 1989). O tamanho do tumor no momento do diagnóstico é fator determinante na indicação ou não do tratamento conservador, além de se constituir ainda, nos casos de pacientes com ausência de comprometimento metastático dos linfonodos, no melhor indicativo de recidiva da doença. Quanto maior o tamanho do tumor, maiores são as chances da existência de comprometimento metastático dos linfonodos loco-regionais (ABREU; KOIFMAN, 2002; SOERJOMATARAM et al., 2008; NCCN, 2017).

Os pacientes com câncer de mama são estratificados em grupos de risco com base em uma combinação de variáveis prognósticas clássicas dependentes do tempo (estadiamento) e variáveis prognósticas e preditivas biológicas. As variáveis de estadiamento incluem, além do tamanho do tumor e do estágio linfonodal, a extensão da disseminação do tumor. O prognóstico da paciente também possui variáveis biológicas clássicas que incluem variáveis morfológicas: tipo e grau do tumor e marcadores moleculares, receptores hormonais e status do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2) (RAKHA e ELLIS, 2011).

1.4.1 Estadiamento

Na busca de avaliar o grau de disseminação das células neoplásicas, faz-se necessário classificar os casos de câncer em estádios, pois as taxas de sobrevida diferem a partir das características tumorais. Para tal, há regras internacionalmente estabelecidas com diferentes variáveis: localização, tamanho ou volume do tumor, invasão direta e linfática, metástases à distância, diagnóstico histopatológico,

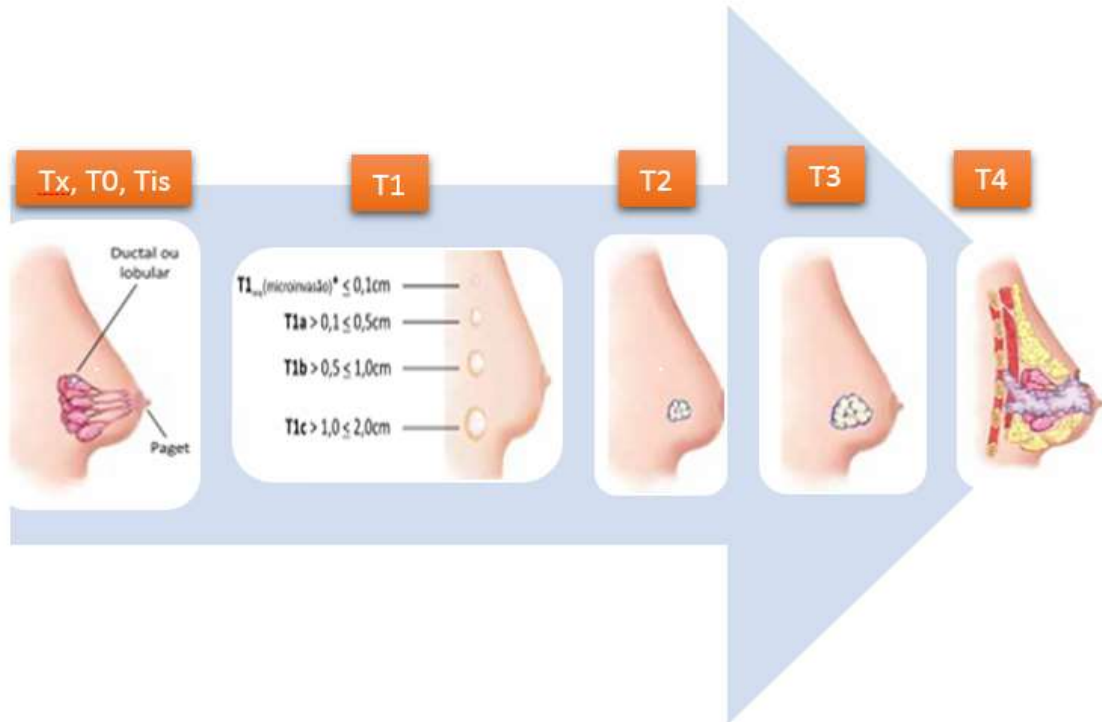
produção de substâncias, manifestações sistêmicas, duração dos sinais e sintomas, sexo e idade do paciente, dentre outros (INCA, 2017; BRASIL, 2004; GADELHA, COSTA e ALMEIDA, 2005; GREENE et al., 2002; BARROS et al., 2001).

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema *Tumor Nodes Metastases* (TNM) de Classificação dos Tumores Malignos (NCCN, 2011).

1.4.1.1 Estadiamento anatômico

Este estadiamento baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T) (Figura 4), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) (Figura 5), e a presença ou ausência de metástases à distância (M) (Figura 6). Classificando o tumor primário por Tx (tumor primário que não pode ser avaliado); T0 (não há evidência de tumor primário), Tis (Carcinoma *in situ*); T1 (tumores ≤ 2 cm); T2 (tumores > 2 cm e ≤ 5 cm); T3 (tumores > 5 cm) e T4 (tumores de qualquer tamanho com extensão direta a parede torácica ou a pele). Uma série de 0-3 depois de N para mostrar se o câncer se difundiu desde sua origem até os gânglios linfáticos próximos, e, em caso afirmativo, quantos linfonodos são invadidos. 0 ou 1 de M para mostrar metástase (disseminação do câncer para órgãos distantes, como ossos ou pulmões) (ANEXO A) (GREENE et al., 2002; BARROS et al., 2001).

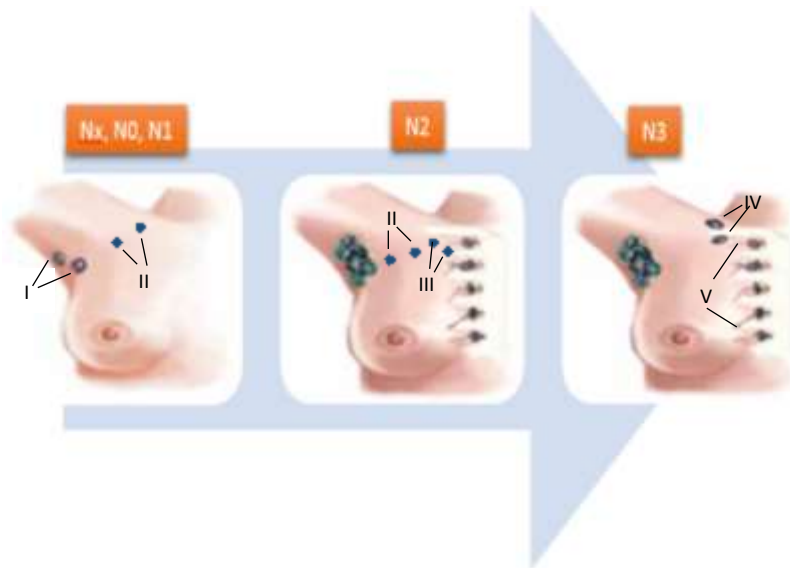
Figura 4 - Classificação de acordo com características do tumor primário



Fonte: INCA, 2004.

Na Figura 4, Tx- o tumor primário não pode ser avaliado; T0- não há evidência de tumor primário; Tis- Carcinoma *in situ*. T1- Tumor ≤ 2 cm em sua maior dimensão. T2- Tumor com mais de 2 cm e até 5 cm em sua maior dimensão. T3- Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão. T4- Tumor de qualquer tamanho, com extensão direta a parede torácica ou a pele (INCA, 2004).

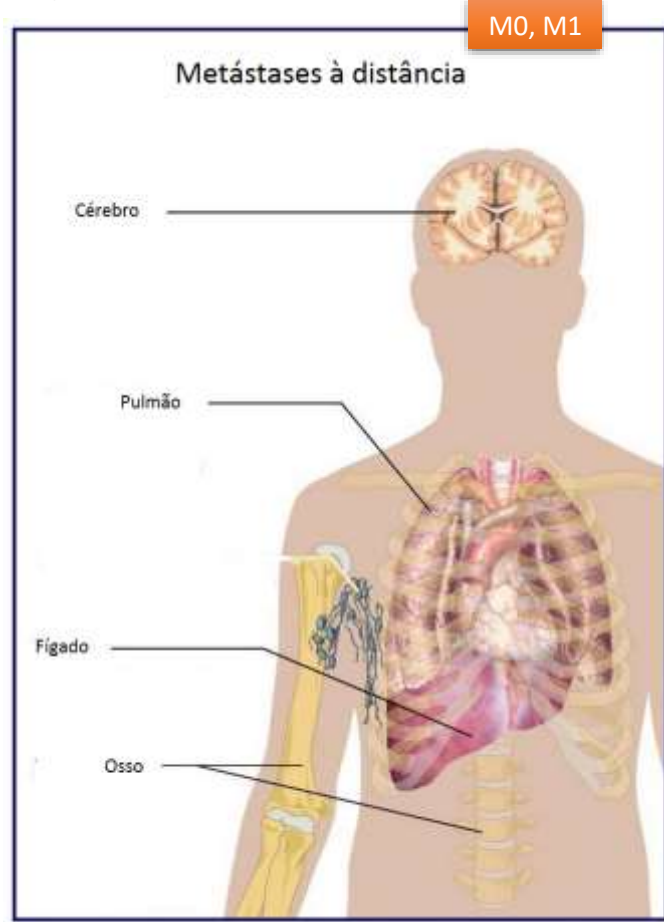
Figura 5 - Classificação de acordo com a extensão do cancro ao nível dos gânglios linfáticos regionais



Fonte: INCA, 2004.

Na figura acima, encontram-se: Nx- linfonodo regional primário não pode ser avaliado; N0- linfonodos regionais sem sinal (is) de metástase; N1- metástases em linfonodo (os) axilar (es) regional (ais) níveis I e II, móvel (eis). N2- metástase em linfonodo (s) regional (ais) nível II e III. N3- metástase em linfonodo (s) regional (ais) intraclavicular (es) (IV) com ou sem comprometimento de linfonodo (s) axilar (es) ou da mama interna (V) (INCA, 2004).

Figura 6 - Metástases à distância



Fonte: www.betterlife.com

Na Figura 6, tem-se: M0- Ausência da metástase à distância; M1-Metástase à distância, que se diferencia de acordo com o tecido afetado.

1.4.1.2 Estadiamento prognóstico clínico

O EPC é baseado em informações provenientes da história clínica, exame físico, exames de imagem e estudos citológicos ou histológicos realizados antes do tratamento. O estadiamento prognóstico clínico inclui cT (clínico - tumor primário), cN (clínico – linfonodos afetados), c/pM (clínico – metástase) (ANEXO A), grau do tumor (G), HER2, RE e RP (ANDRADE, 2018).

1.4.1.3 Estadiamento prognóstico patológico

O EPP se aplica apenas aos pacientes submetidos à ressecção cirúrgica como tratamento inicial do câncer de mama. Baseia-se na associação das informações clínicas, dados anatomopatológicos provenientes da peça cirúrgica associados aos resultados dos fatores prognósticos. Consiste na combinação dos seguintes dados: pT (patológico - tumor primário), pN (patológico – linfonodos afetados), c/pM (patológico – metástase) (ANEXO A), G, HER2, RE e RP (ANDRADE, 2018).

1.5 Tratamento

Os métodos disponíveis para tratar o câncer de mama devem ser ministrados por uma equipe multidisciplinar visando o tratamento da paciente de forma sistêmica (SILVA; ALBUQUERQUE, 2010; INCA,2015; DIAS *et al*, 2017).

O prognóstico do CM depende da extensão da doença (estadiamento), assim como das características do tumor. Quando a doença é diagnosticada no início, o tratamento tem maior potencial curativo. Quando há evidências de metástases, o tratamento tem por objetivos principais prolongar a sobrevida e melhorar a qualidade de vida (NCCN, 2011; INCA, 2015). Dentre os principais tratamentos do câncer de mama temos os seguintes.

1.5.1 Tratamento local

1.5.1.1 Cirurgia

A cirurgia é o principal tratamento do câncer de mama, ela inclui a intervenção cirúrgica na mama e axila. Evolutivamente, os procedimentos cirúrgicos caminham de tratamentos mais agressivos para conservadores e com maior ganho cosmético sem afetar a curabilidade das pacientes (MINISTERIO DA SAUDE, 2015).

O tratamento conservador no câncer de mama é aceitável para a maioria das mulheres, porém existem exceções de aplicabilidade e necessitam de adjuvância com radioterapia. Dentre as principais contraindicações ao tratamento conservador estão: a persistência de margens positivas após várias tentativas de reexcisão,

doença multicêntrica (dois ou mais tumores primários em quadrantes de mama separados), aparência difusa das microcalcificações na mamografia, sugerindo multacentricidade e gravidez, embora possa ser possível fazer uma cirurgia conservadora no último trimestre e a radioterapia após o parto (MARTA *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2017).

A indicação de diferentes tipos de cirurgia (Quadro 2) depende do estadiamento clínico e do tipo histológico, portanto pode ser conservadora com a ressecção de um segmento da mama com margens livres (engloba a setorectomia, a tumorectomia alargada e a quadrantectomia), com retirada dos gânglios axilares ou linfonodo sentinela, ou não conservadora (mastectomia total) (BRASIL, 2008; ARAUJO *et al.*, 2017).

Quadro 2 - Tipos de cirurgias no tratamento do câncer de mama

Tipos de Cirurgias	Ato Cirúrgico	Abordagem axilar
Mastectomia Radical Clássica - (cirurgia de Halsted)	Consiste na retirada da glândula mamária associada a retirada dos músculos peitorais	Linfadenectomia total
Mastectomia Radical Modificada	A preservação de um (Pattey-Dyson) ou ambos (Madden-Auchinclos) músculos peitorais, e a utilização de incisão transversa (incisão de Stuart)	Biópsia do linfonodo sentinela
Mastectomia Simples ou Total	Remoção exclusiva da glândula mamária.	Biópsia do linfonodo sentinela
Tumorectomia	Consiste na ressecção total do tumor, sem preocupação de se estabelecer margem de segurança	Biópsia do linfonodo sentinela
Setorectomia	Ressecção do setor que engloba o tumor, com margem de segurança de, pelo menos, 1 cm	Biópsia do linfonodo sentinela
Quadrantectomia	Ressecção de qualquer setor mamário que alberga o tumor, com ampla margem de segurança, da pele suprajacente e da aponeurose do músculo grande peitoral subjacente	Biópsia do linfonodo sentinela

Fonte: ARNAUD (2010).

Muito se discute sobre o tratamento conservador, no qual realiza-se a remoção de um volume de tecido mamário sadio suficiente para obter margem cirúrgica livre de neoplasia, porém procura-se evitar excisões e dissecções amplas a fim de possibilitar um melhor resultado estético. Entre os tratamentos conservadores, podemos destacar a tumorectomia, setorectomia e quadrantectomia (TIEZZI, 2007).

A mastectomia parcial é a remoção do tumor com uma margem de tecido mamário normal de aproximadamente 1 cm de diâmetro em todos os lados do tumor (SPENCE; JOHSTON, 2001). Ela se mostra inadequada para tumores > 5 cm (ou tumores menores, caso a mama seja pequena), tumores que afetam o complexo areolar do mamilo, tumores com doença intraductal extensa que afeta múltiplos quadrantes da mama, mulheres com história de doença vascular do colágeno e as que não se sentem motivadas a preservar as mamas ou não tem fácil acesso a radioterapia (LONGO *et al.*, 2013). A mastectomia parcial sempre deve ser suplementada por radioterapia como parte do tratamento primário (MARTA *et al.*, 2011).

A mastectomia total ou radical clássica é a remoção de todo o tecido mamário do lado afetado, e vem sendo substituída pela mastectomia radical modificada, buscando a diminuição das comorbidades e da melhora no efeito cosmético. A mastectomia radical modificada é a forma mais comum de mastectomia, durante a qual se retira a mama inteira, mas os músculos da parede torácica são preservados. Com a preservação dos músculos do peito, é preservada a força dos braços (NCCN, 2011).

A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) e/ou esvaziamento de linfonodos axilares (EA) podem ser realizados simultaneamente a mastectomia parcial ou total (Quadro 2), tendo como objetivos a avaliação das metástases nos linfonodos axilares e evitar a recorrência na axila, respectivamente. (NCCN, 2011).

1.5.1.2 Radioterapia

A radioterapia é um método administrado externamente, que emprega feixes de radiações ionizantes na região afetada, onde os raios ionizantes bloqueiam a divisão celular ou determinam a destruição do tumor. É utilizada com o objetivo de destruir as células remanescentes após a cirurgia ou para reduzir o tamanho do tumor antes da cirurgia. Seus efeitos tóxicos são localizados, podendo ocasionar irritações ou leves queimaduras na pele, inflamações das mucosas, queda de pelos ou cabelos nas áreas irradiadas e diminuição na contagem das células do sangue. (GENÇ; TAN, 2011).

A cirurgia conservadora da mama, que se fundamenta na retirada cirúrgica do tumor e no manejo axilar não invasivo, seguida de radioterapia, é o tratamento local

padrão para a doença tanto em estádios iniciais quanto avançados (MARTA et al., 2011).

1.5.2 Tratamento sistêmico

1.5.2.1 Terapia biológica

A terapia biológica ou molecular consiste em usar fármacos que atuem fundamentalmente nas células cancerosas afetando minimamente as normais, tendo, assim, menos efeitos adversos (DEL DEBBIO *et al.*, 2007). A expressão dos receptores hormonais, receptores de estrógeno e receptores de progesterona, e a expressão ou ampliação do fator de crescimento humano epidérmico receptor-2 foram identificadas como importantes fatores preditivos entre as pacientes com câncer de mama (SALLES *et al.*, 2009; KARGER e FREIBURG, 2010; HADDAD, 2010). Atualmente, esses marcadores são utilizados para definir o tratamento e o prognóstico da doença, juntamente com as variáveis clínicas e patológicas (VALLEJOS *et al.*, 2010; LLOYD *et al.*, 2010).

Aproximadamente 70% dos tumores da mama expressam RE e RP no núcleo tumoral e, portanto, são proponentes à hormonioterapia. Dentre as hormonioterapias utilizadas atualmente, se destacam os medicamentos bloqueadores dos receptores de estrogênio (tamoxifeno, toremifeno, fulvestrant) (Quadro 3) e os inibidores de produção do estrogênio (inibidores de aromatase, acetato megestrol, ablação Ovariana). No cancro da mama em estágio inicial, a hormonioterapia é administrada por 5 anos com o objetivo de prevenir as recidivas (ACS, 2016).

Quadro 3 - Fármacos sistêmicos mais comuns para o câncer de mama

Tipo	Grupo	Exemplos	Mecanismo principal
Alcalóides	Mostarda nitrogenada	Ciclofosfamida, ifosfamida	Ligação cruzada entre as fitas de DNA
Antimetabólicos	Antagonista de folato, via de purina	Fluoruracila, citarabina	Bloqueio da síntese de DNA e/ou RNA
Antibióticos Citotóxicos	Antraciclinas	Doxorrubicina, epirrubicina	Múltiplos efeitos na síntese de DNA/RNA e na ação de topoisomerase
Derivados de Plantas	Taxanos	Paclitaxel, docetaxel	Arrumação dos microtúbulos; impede a formação do fuso mitótico
Hormônios/ antagonistas	Antagonistas	Tamoxifeno, toremifina	Atuam como antagonistas fisiológicos, antagonistas ou inibidores da síntese de hormônios para interromper o crescimento de tumores hormônio-dependentes
Inibidores de Proteína quinase	Inibidores da tirosina Quinase	Dasatinibe, eriotimbe	Inibição das quinases envolvidas na transdução do sinal de receptores do fator de crescimento
Anticorpos monoclonais	Anti-EGF, EGF-2	Panitumumabe, trastuzumabe	Bloqueia a proliferação celular

Fonte: Adaptado de RANG et al. (2002).

Outros 20% apresentam amplificação para HER2 e podem se beneficiar de terapia alvo dirigida, com a droga trastuzumab (anticorpo monoclonal) (PEREZ *et al*, 2011; DOWSET *et al.*, 2006; HADDAD, 2010 (Quadro 3). Esse medicamento pode ser utilizado em neoadjuvância para diminuir o tamanho do tumor para realizar a cirurgia posteriormente, bem como em adjuvância, após tratamento cirúrgico. Vários estudos indicam que é eficaz no tratamento dos tumores precoces HER2 positivos e nos tumores metastáticos HER2 positivos. O trastuzumab é administrado por via endovenosa por 1 ano como terapêutica adjuvante, iniciando juntamente com a quimioterapia e a sua administração prolonga-se após o fim da quimioterapia até ser completado o esquema (NCCN, 2011).

1.5.2.2 Quimioterapia

Nas últimas décadas, a área da quimioterapia antineoplásica tem permitido maior sobrevivência dos portadores de câncer e aumento na incidência de curas através de agentes químicos que interferem no processo de crescimento e divisão celular podendo ser usados tanto isolados como em combinação com a finalidade de eliminar células tumorais do organismo (INSTITUTO ONCOGUA, 2014). Atualmente, a quimioterapia é utilizada em três circunstâncias clínicas relevantes: no tratamento para cânceres para os quais não existam outro tratamento eficaz, no tratamento neoadjuvante, ou seja, antes do método terapêutico localizado (cirurgia ou

radioterapia) e no tratamento adjuvante a essas formas locais de terapia (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A quimioterapia é mais eficaz quando combinações de dois ou mais medicamentos são utilizados, sendo capaz de retardar o mecanismo de crescimento tumoral, possibilitando melhores respostas ao tratamento. As principais vantagens da poliquimioterapia são o efeito aditivo que é produzido; a potencialização do efeito terapêutico de uma droga com o uso concomitante da outra; diminuição da resistência tumoral; possibilidades de redução nas doses e, conseqüentemente, diminuição dos efeitos tóxicos e colaterais (DA SILVA; ÁVILA; SOARES, 2013). No quadro 3, encontram-se os principais fármacos utilizados no câncer de mama.

A quimioterapia é dada em ciclos de dias de tratamentos intervalados por dias de descanso, podendo variar de acordo com os fármacos utilizados. Frequentemente são ciclos de 14, 21, ou 28 dias (NCCN, 2011).

2 TRATAMENTO CIRÚRGICO COM ABORDAGEM AXILAR NO CÂNCER DE MAMA

Atualmente, o tratamento da neoplasia maligna da mama passou a ser conduzido por uma equipe multidisciplinar, além da equipe cirúrgica, composta por patologista, radiologista, oncologista clínico, radioterapeuta e equipe de reabilitação e suporte. Diante dos novos conhecimentos sobre a fisiopatológica do câncer de mama e de sua biologia celular, o tratamento cirúrgico passou por importantes evoluções nas técnicas e na abordagem do controle local da doença (VASQUES, 2016).

O tratamento cirúrgico conservador do tumor de mama passou a ser prioridade entre os métodos cirúrgicos, devido a uma série de fatores, como: entendimento da doença neoplásica da mama como sistêmica desde o início; baixo índice de colonização dos linfonodos axilares nas peças cirúrgicas; morbidade associada ao esvaziamento axilar; expansão da conscientização sobre a importância da mamografia, trazendo à clínica tumores em estádios iniciais, passíveis de ressecções menos radicais; aprimoramento das técnicas de cirurgia plásticas da mama; o tratamento de uma política seletiva no manejo da axila, por meio do linfonodo sentinela e questionamentos femininos com relação a necessidade de extirpações mamárias (FISHER *et al.*, 2002; VASQUES, 2016).

Antes da realização de estudos que legitimassem o papel da cirurgia conservadora no tratamento adequado da doença, utilizou-se por décadas o tratamento cirúrgico clássico do câncer de mama citado por Halsted, no qual o esvaziamento axilar ou dissecação axilar completa era considerado o procedimento de escolha para o estadiamento e tratamento da axila em casos de carcinoma invasivo da mama. O EA consiste na ressecção dos linfonodos da região axilar, localizados lateralmente, medialmente e sob o músculo pequeno peitoral, tendo como consequências muitas morbidades para paciente, em particular, linfedema, seroma, alterações na sensibilidade local, internação prolongada, dor crônica e dificuldade de mobilização do braço (FISHER, 1977; 1980; FISHER *et al.*, 2002; TIEZZI, 2007; VERONESI *et al.*, 2002; VASQUES, 2016).

O princípio existente na cirurgia oncológica da extirpação em bloco do tumor primário e da sua drenagem linfática ainda permanecem como métodos importantes de tratamento do câncer. Entretanto, questiona-se a amplitude do esvaziamento axilar no câncer de mama. Algumas considerações devem ser levadas

em conta antes de se realizar a cirurgia axilar: a relevância para o prognóstico da doença, o controle locorregional da neoplasia e se haverá aumento da sobrevida (URBAN *et al.*, 2001).

Em até 75% das pacientes com carcinomas precoces de mama e axila clinicamente negativa não se encontram linfonodos metastáticos nas disseções axilares (DEES *et al.*, 1997). Estimulados por esta observação e com o intuito de evitar a alta morbidade do EA, Krag e Giuliano descreveram uma técnica anteriormente utilizada no estadiamento de pacientes com câncer de pênis (FOWLER *et al.*, 1984) e vulva (DISAIA *et al.*, 1979), a biópsia do linfonodo sentinela, na determinação do status linfonodal axilar em pacientes com tumores iniciais de mama, evitando-se a realização do EA quando a BLS era negativa (KRAG *et al.*, 1993; GIULIANO *et al.*, 1994).

Com a evolução na técnica da BLS, observou-se a redução da morbidade relacionada ao procedimento, entretanto, não eliminou completamente os riscos, como linfedema (8,3%). Por este motivo, há muito se investigam métodos de imagem não invasivos, nas perspectivas de oferecer informações com acurácia semelhante a BLS, capazes de avaliar o estado axilar sem adicionar morbidade cirúrgica e menores custos totais, com perspectivas promissoras (GRAVERSEN *et al.*, 1988; URBAN *et al.*, 2001; LERNEVALL, 2000; LIM *et al.*, 2000).

Dentre os métodos de imagem mais utilizados para avaliar a axila em pacientes com CM estão: linfocintilografia (LC); tomografia computadorizada (TC), ultrassonografia (US), tomografia com emissão de pósitron com fluordesoxiglicose (PET) e ressonância nuclear magnética (RNM). Apesar de ser uma área promissora, estes métodos ainda carecem de evidências científicas robustas antes de substituir a BLS (LERNEVALL, 2000; LIM *et al.*, 2000). Na realidade atual, a BLS é o método de excelência na avaliação axilar e na definição do prognóstico do câncer de mama (LYMAN *et al.*, 2005; VASQUES, 2016).

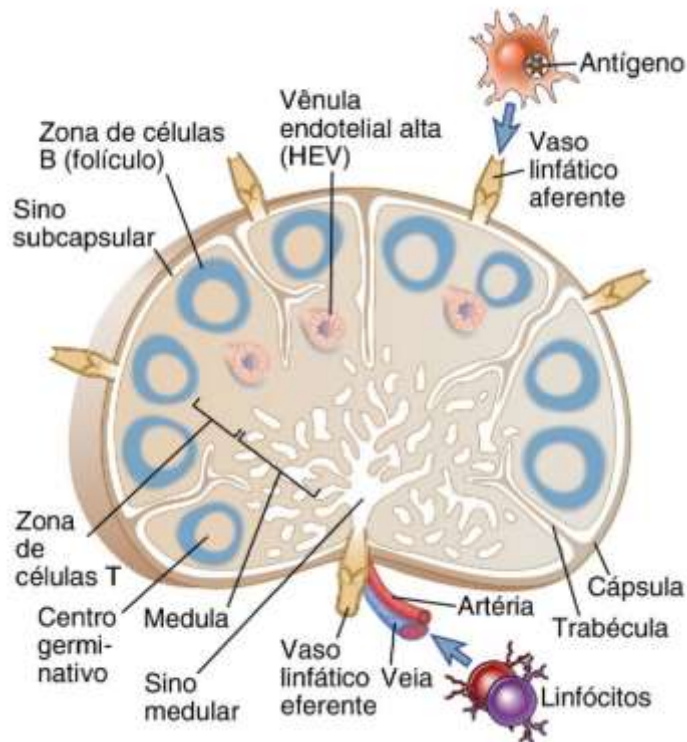
2.1 Linfonodos no câncer de mama

2.1.1 Os linfonodos e o sistema linfático

As respostas imunológicas adquiridas são iniciadas em pequenos agregados de tecidos ricos em linfócitos localizados em toda a extensão dos canais linfáticos ao longo do corpo, chamado de linfonodo. Este órgão constitui de um córtex

externo e uma medula interna, cercado por uma capsula fibrosa através da qual penetram inúmeros vasos linfáticos aferentes que liberam a linfa em um seio subcapsular (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2005; PARSLOW, 2000) (Figura 7).

Figura 7 - Anatomia do linfonodo



Fonte: Abbas, Imunologia Celular e Molecular, tradução da 8ª edição.

Os antígenos são transportados para os linfonodos principalmente pelos vasos linfáticos. A pele, os epitélios e os órgãos parenquimatosos contêm numerosos capilares linfáticos que absorvem e drenam o líquido intersticial (derivado da filtração do plasma) desses locais. O líquido intersticial absorvido, chamado de linfa, flui pelos capilares linfáticos para os vasos convergentes, progressivamente maiores, até atingirem um grande vaso linfático chamado ducto torácico, onde é drenado para veia cava superior retornando, assim, o líquido para o sangue (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2005; PARSLOW, 2000).

Quando a linfa entra no linfonodo pelo vaso linfático aferente, ele é filtrado pelo seu estroma. As células dendríticas que transportam antígenos, entram na zona de células T e lá permanecem. Antígenos solúveis da linfa podem ser dela extraídos

por células, como as células dentríticas e os macrófagos, que residem no estroma do linfonodo. O resultado final da captura do antígeno pelos diferentes tipos celulares é a sua acumulação e concentração no linfonodo, e a apresentação do antígeno de uma maneira que ele possa ser reconhecido pelos linfócitos T específicos (ABBAS; LIICHTMAN, 2005).

Os linfonodos dos pacientes com câncer, podem receber células atípicas geradas pelo tumor primário, que são capazes de adquirir a capacidade de se desprender do tumor e de migrar. Propagando-se inicialmente nos tecidos vizinhos, estas células podem chegar ao interior do vaso linfático e, através desses disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou (BRASIL, 1996).

O primeiro estudo descritivo interligando a drenagem linfática à progressão da neoplasia de mama foi realizado no início do século XVIII, por Henry François Le Dran, que esboçou a progressão do câncer de mama por via linfática. A partir desse pressuposto, a drenagem linfática da mama é estudada por vários pesquisadores. Atualmente, sabemos que os vasos linfáticos da pele circundam a aréola e o mamilo, drenando para linfonodos axilares ipsilaterais, cervicais profundos, deltopeitorais e linfonodos da cadeia torácica interna (ROSES, 2005). O fluxo linfático é eferente, dos vasos linfáticos intramamários e subcutâneos profundos em direção aos linfonodos mamários internos e axilares (VASQUES, 2016).

2.1.2 Linfonodo sentinela no câncer de mama

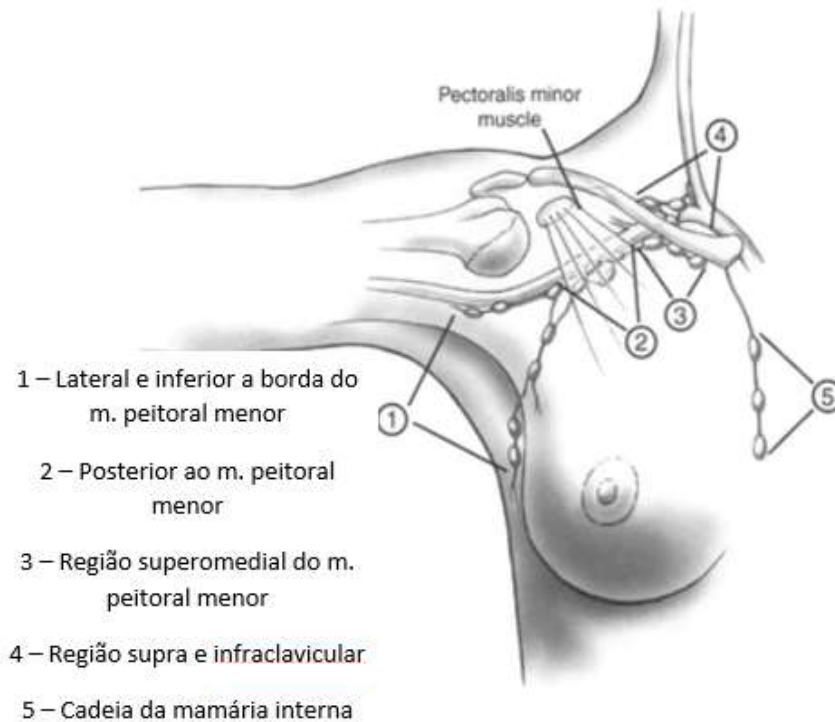
Na sua tese de graduação Ramón Cabanas, em 1969, na *Universidad Nacional de Asunción Facultad de Ciencias Medicas* no Paraguai, foi pioneiro no estudo da drenagem linfática nas neoplasias malignas com o intuito de encontrar uma maneira de determinar com acurácia a necessidade do esvaziamento linfonodal. Foi analisado 250 linfogramas, incluindo vários tipos de tumores, incluindo pênis, testículo, mama, melanoma, ânus, reto e linfomas. Foi visto, em especial, nos casos de câncer de pênis, cujo observou que, quando o corante era injetado no dorso do pênis, opacificava uma cadeia limitada de linfonodos, localizada na superfície da região inguinal. Tendo como a primeira evidência de um centro primário específico de drenagem linfática, que foi chamado de linfonodo sentinela (LS). Desse modo, Cabanas obteve grande relevância na descrição dos fundamentos para a compreensão desse novo conceito em cirurgia oncológica (CABANAS, 1977).

Tendo como base os princípios da cirurgia oncológica no tocante ao tratamento linfonodal, surge a necessidade de um estudo preciso da axila no câncer de mama, buscando reduzir a morbidade nas cirurgias mamárias. Portanto, surgiu um novo método para o estadiamento da axila, que visa inicialmente à identificação do primeiro linfonodo conectado a drenagem linfática do tumor primário na mama (CABANAS, 1977). Baseando-se nesse conceito, após a identificação e ressecção desse linfonodo, se o exame histopatológico mostrar que o mesmo não está comprometido por metástase, assume-se que existem baixa possibilidade de existir metástase em outros linfonodos axilares mais distantes e que o tumor, provavelmente, está mantido tecido primário (URBAN *et al.*, 2001).

A definição do LS é embasada na existência de um rede de drenagem linfática gradativa e previsível para um linfonodo na região, assim, o linfonodo serve de filtro para células tumorais, no qual a presença de metástase no LS pode predizer a necessidade do esvaziamento axilar e um marcador para doença mais avançada (BOFF *et al.*, 2006; URBAN *et al.*, 2001; TANIS *et al.*, 2001).

A mama é composta por um tecido rico em canais linfáticos que acompanham a circulação venosa. A principal rota de drenagem da mama é para linfonodos axilares, recebendo 97% da linfa mamária (TUNER- WARWICK, 1959). Na axila, a linfa atinge em média 20 a 40 linfonodos, onde se define a progressão do câncer de mama com a observação do nível linfonodal das células metastáticas na cadeia linfática. Uma forma alternativa de delinear a anatomia patológica dos linfonodos axilares é dividi-los em níveis, conforme a classificação de Berg (Figura 8) (NETTTER, 2000).

Figura 8 - Drenagem linfática da mama humana



Fonte: Disponível em:

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-3656-4_25#page-1

Na Figura 8, podem-se observar os principais locais de drenagem e grupos linfonodais. O Nível I contém em média 15 a 18 linfonodos (65%) localizados lateral e inferiormente à borda do músculo peitoral menor; já o Nível II tem de 10 a 12 linfonodos (25%) localizados posteriormente ao músculo peitoral menor e o Nível III de 6 a 8 linfonodos apicais (10%) localizados na região superomedial ao músculo peitoral menor.

No início dos trabalhos sobre drenagem linfática tumoral se pensava que tumores em variados quadrantes drenavam para LS diferentes (ESTOURGIE *et al.*, 2004). Nos últimos anos, várias evidências sobre a anatomia funcional da drenagem linfática da mama, como também o aumento do uso do mapeamento linfático e da experiência na biópsia do linfonodo sentinela, fortaleceram as evidências da teoria de que os linfáticos da glândula mamária drenam por meio de poucos troncos linfáticos aferentes comuns para o LS, independentes dos quadrantes onde se origina o tumor (BORGSTEIN *et al.*, 2000; CHAO *et al.*, 2001; GRANT *et al.*, 1953; HALSELL *et al.*,

1965; KLIMBERG *et al.*, 1999; NATHANSON *et al.*, 2001; TURNER-WARWICK, 1959; TUTTLE, 2004). A origem embriológica comum justifica o princípio que todo parênquima mamário e a pele que cobre a mama drenam para um mesmo linfonodo axilar, assim, respaldam as afirmações citadas anteriormente (NIEWEG *et al.*, 2004).

2.2 Biópsia do linfonodo sentinela

O status axilar é o fator prognóstico isolado mais importante nos tumores de mama iniciais. Na busca do controle local para pacientes com axila comprometida utiliza-se no tratamento cirúrgico convencional a dissecação dos linfonodos axilares, como forma de estadiamento e terapêutica. No entanto, com os avanços no rastreamento mamográfico e com o consequente aumento do diagnóstico de tumores em fases iniciais, revelou-se um baixo índice de acometimento axilar para tais lesões, demonstrando que o esvaziamento axilar total é desnecessário na maioria das pacientes com câncer de mama em estágio inicial (ORUCEVIC *et al.*, 2002).

O esvaziamento axilar possui várias complicações relatadas, algumas imediatas como hemorragia, infecção, seroma, deiscência de sutura e necrose, e outras tardias como linfedema de membro superior, redução da amplitude de movimento do ombro, dor crônica, atrofia de músculos peitorais, escápula alada, fraqueza, parestesia no braço e axila homolaterais à cirurgia (FERREIRA, 2008; TORREZAN *et al.*, 2002; MAGALDI *et al.*, 2005; PIMENTEL *et al.*, 2007). Estas últimas complicações têm como causa lesão de nervos durante a cirurgia. A atrofia dos músculos peitorais ocorre devido à secção dos nervos motores peitoral medial e lateral e a “escápula alada” devido à lesão do nervo torácico longo que inerva o músculo serrátil anterior. A lesão do nervo sensitivo intercostobraquial é responsável por queixa duradoura das pacientes que se apresenta como anestesia, hipoestesia podendo ocorrer também hiperestesia (dor, latejamento, pontada ou queimação), que gera grande desconforto para as pacientes e está frequentemente associado à maior morbidade (TEICHER *et al.*, 1982). Estas alterações sensoriais ocorrem na região medial e pósterio-superior do braço e axila (TEICHER *et al.*, 1982; PIMENTEL *et al.*, 2007)

Diante de tais observações, a biópsia do linfonodo sentinela vem se fixando como protocolo de rotina nos últimos anos, sendo um importante método de estadiamento e de substituição para o esvaziamento axilar total no tratamento dos

cânceres de mama iniciais T1 e T2 (tumores ≤ 3 cm), tendo como objetivo a identificação e a retirada do LS para análise. Caso o exame patológico revelar ausência de metástase no LS, considera-se que os demais linfonodos, localizados distalmente, também não estarão comprometidos. Entretanto, a presença de metástase no LS é indicação de esvaziamento axilar e marcador de doença mais avançada (SHWARTZ et al, 2001; MATTES et al., 2015; QUADROS e GEBRIM, 2007; PAZ et al., 2001).

As principais indicações para a realização da BLS consistem em axila clinicamente negativa, tumores T1 e T2 pequenos (3 cm ou menos), tumores primários de mama, câncer invasivo de mama e câncer de mama operável (BARROS *et al.*, 2001; URBAN *et al.*, 2001). Entretanto, existem contraindicações: axila clinicamente positiva; tumores localmente avançados; cirurgia axilar prévia; radioterapia prévia; quimioterapia neoadjuvante; gestação e lactação; tumores multicêntricos e multifocais, mamoplastia de aumento com próteses de silicone por incisão axilar e alergias ao corante e/ou ao radiofármaco utilizado na detecção do LS. São contraindicações relativas: alto índice de massa corporal e idade acima de 60 anos; tumor primário nos quadrantes internos e mamoplastia redutora prévia (SHWARTZ *et al.*, 2001; GALEB, 2000; PAZ *et al.*, 2001; BOFF *et al.*, 2006).

Atualmente, as três principais técnicas de identificação do LS: injeção de corante, injeção de substância radioativa ou associação das duas técnicas (VASQUES *et al.*, 2016; AGUIAR *et al.*, 2017). Giuliano em 1999, obteve expressivos índices de identificação entre 68% e 99% com o uso do corante (isosulfan ou azul patente). Com resultados semelhantes, Veronesi e colaboradores, aplicaram a técnica utilizando somente o radioisótopo tecnécio (VERONESI, 1977). Após estas técnicas serem empregadas isoladamente de forma satisfatória, Bass *et al.* observaram em sua pesquisa que a associação das duas técnicas se mostrou contraditória, tendo uma maior porcentagem de identificação do LS com as técnicas usadas isoladamente (BASS et al., 1999). Entretanto, o índice de falso-negativo foi menor com a associação das duas técnicas empregadas por Wong *et al* em 2002.

Associado à identificação do LS teremos a análise anatomopatológica na execução da BLS, na qual o patologista terá apenas um ou pequeno número de linfonodos para examinar mais detalhadamente, ao invés de um maior número de linfonodos proveniente da dissecação axilar total. Tendo, assim, um aumento na sensibilidade em comparação à histologia de rotina (BORGHETTI *et al.*, 2000).

2.2.1 Protocolo da técnica de biópsia do linfonodo sentinela

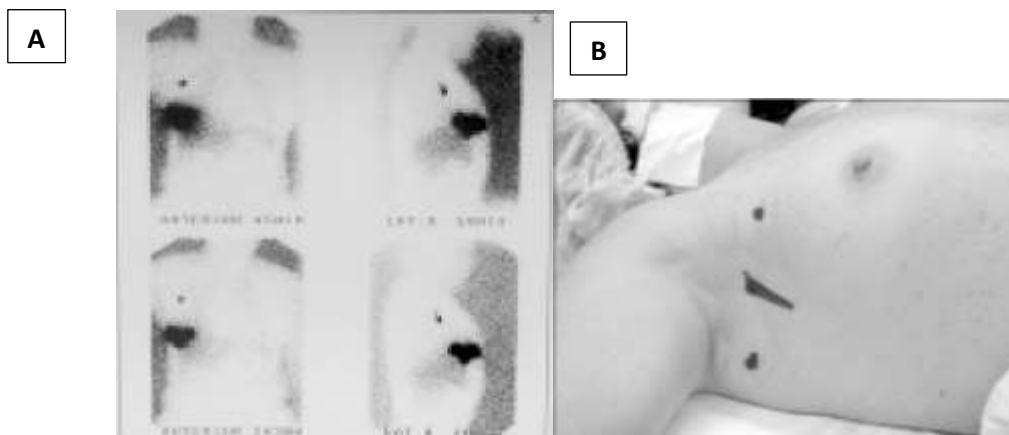
2.2.1.1. Pré-operatório: linfocintilografia

Frequentemente, utiliza-se como radiofarmaco o colóide fitato, marcado com Tc 99m. Ajustando a dose radioativa de acordo com o tempo programado entre a linfocintilografia e a cirurgia, assim, as doses variam entre 0,8 – 1 mCi para exame realizado no dia anterior a cirurgia e 0,4mCi para exame realizado apenas no dia da cirurgia (MARIANI *et al*, 2001; PAZ *et al.*, 2001; LIU, WANG e ISAI, 2000).

O radiofármaco deve ser administrado através de injeção intradérmica de 0,2 mL da solução em quatro pontos cardeais sobre a projeção cutânea do tumor, com as pacientes em posição supina. Imediatamente após a injeção, recomenda-se uma massagem efetiva sobre a área, por aproximadamente 2 minutos, com a intenção de promover a migração e o transporte linfático das partículas de radiocolóide (MARIANI *et al*, 2001; PAZ *et al.*, 2001).

Entre 30 minutos a 2 horas da injeção, obtém-se imagens planares estáticas anteriores e laterais, com as pacientes em posição supina, nas quais um médico da equipe de medicina nuclear identifica a primeira captação focal distinta da imagem da atividade injetada (Figura 9A). Após a localização dos linfonodos, a projeção cutânea de captações focais é marcada em ambas incidências, como referência para a incisão axilar e a localização dos LS (Figura 9B) (PAZ *et al.*, 2001).

Figura 9 - A) Linfocintilografia de mama e B) Marcação cutânea



Fonte: Adaptado de Paz *et al.*, 2001.

A Figura 9-A contém uma linfocintilografia de mama, na qual a captação focal distinta representa o linfonodo sentinela. Já na Figura 9-B, há a marcação cutânea da captação focal em dois planos. O traço representa a borda do músculo peitoral maior.

2.2.1.2 Técnica cirúrgica

É de grande importância uma equipe multidisciplinar com experiência, antes de implantar a nova técnica como rotina (QUADROS e GEBRIM, 2007). Deve-se previamente informar a paciente da possibilidade de linfadenectomia axilar e suas complicações, caso não seja possível identificar o linfonodo sentinela ou em caso este esteja comprometido. Alguns centros têm a disponibilidade de uso de radiofármacos (Tc 99m e sua utilização é feita de forma isolada ou associada ao corante azul patente, por trazer maior possibilidade de detecção do LS. Assim, realiza-se a linfocintilografia e a marcação cutânea para que o cirurgião possa fazer a incisão na pele próximo da lesão tumoral (Figura 9). O uso do “gama probe” ajuda localização pelo cirurgião, por conta da emissão de radiação advinda do linfonodo impregnado por Tc 99m (CHAGPAR *et al.*, 2005). Quando o centro não tem medicina nuclear, frequentemente nos serviços públicos, por conta dos escassos recursos financeiros, pode-se usar apenas o azul patente ou azul de isossulfan (MAZA *et al.*, 2003).

Diferentes locais de injeção do radiofármaco têm sido recomendados para detecção do LS, mas a injeção periareolar ou subareolar apresenta mais benefícios, principalmente nas lesões não palpáveis, por representar o ponto de convergência de das vias da drenagem linfática da mama (QUADROS e GEBRIM, 2007).

Após a indução anestésica, aplica-se o corante com uma injeção periareolar superior de 2,0 mL de azul patente, divididos em quatro pontos com 0,5 mL cada, objetivando diminuir a possibilidade de impregnação dérmica (TARRICONE *et al.*, 2012). Faz-se uma suave massagem no local da injeção e espera-se de 7-10 minutos para iniciar o procedimento. Quando o tumor se localiza no quadrante súperolateral realiza-se uma incisão radiada, e pode-se assim identificar o bordo lateral do músculo grande peitoral, com a abertura da fásia clavipeitoral, identificando-se após delicada dissecação o vaso linfático coletor corado em azul até o LS, que, após ligadura dos vasos aferentes, é retirado e enviado para exame

histopatológico. Realiza-se uma cuidadosa observação axilar à procura de outros linfonodos corados (para-sentinelas), assim como palpação para detecção de eventuais linfonodos suspeitos, que devem ser retirados e enviados para exame. Quando o tumor não se localiza no quadrante súperolateral, é realizada uma incisão axilar de 2 a 3 cm, com procedimento igual ao descrito (QUADROS e GEBRIM, 2007).

2.2.1.3 Análise citológica e histopatológica

Assim que o LS (ou os linfonodos-sentinelas) é (são) identificado (s) e retirado (s) pelo cirurgião, é enviado ao patologista, que inicia o exame intra-operatório, realizando cortes de 2 mm em cada linfonodo. Em seguida, a análise citológica (*imprints*) de cada fatia e cortes de congelação de cada fatia para avaliação histológica. No material submetido ao *imprint*, são realizadas duas colorações – uma rápida com corante metacromático (Instant Prov) e outra com hematoxilina eosina (HE). Nas lâminas obtidas por congelação, também se aplica HE. Utilizando-se ambos os métodos – citologia e corte de congelação –, o risco de falso-negativo diminui (SHWARTZ *et al*, 2001).

Havendo positividade de células metastáticas no LS, o esvaziamento axilar é então realizado. Na obtenção de um resultado negativo, o cirurgião cessa o procedimento cirúrgico. No entanto, o material é posteriormente incluso em parafina e corado novamente com HE. Caso houver positividade a partir desse momento, o mastologista é comunicado e a paciente é, então, submetida a outra intervenção cirúrgica, para esvaziamento axilar (SHWARTZ *et al*, 2001).

2.3 Marcadores do linfonodo sentinela

O aumento na indicação da BLS em diversos tumores incentivou a pesquisa no desenvolvimento de novos marcadores. Há uma diversidade de marcadores desenvolvidos em todo o mundo: substâncias radioativas, partículas magnéticas, substâncias fluorescentes, dentre outras (PINHEIRO *et al*, 2010, VASQUES, 2016; AGUIAR *et al.*, 2017).

2.3.1 Corantes vitais

No ato cirúrgico, a injeção do corante azul facilita na identificação de drenagem linfática do tumor por impregnação dele na rede linfática, o que viabiliza seguir a trama dos ductos linfáticos corados e identifica o primeiro linfonodo (linfonodo sentinela) que recebe o marcador. Distintos corantes vitais foram utilizados na identificação do gânglio sentinela: o azul patente, o azul de isossulfan e, mais raramente, o azul de metileno (GIULIANO *et al.*, 1994). Esse último é mais facilmente encontrado para comercialização e a um preço bem menor. Segundo alguns autores o azul de metileno difunde mais rapidamente pelos tecidos periféricos, tingindo maior extensão da mama e, de certa forma, dificultando o procedimento. Outros, porém, encontraram a mesma acurácia e mesma taxa de detecção do gânglio sentinela comparando ao azul patente (BLESSING *et al.*, 2002; ZUO; WANG, 2001). Parece ainda haver menor risco de anafilaxia com o azul de metileno, em comparação aos outros corantes (MULLAN; DEACOCK; KISSIN, 2001; AHLGREN, 1999).

Os corantes vitais utilizados na BLS possuem como principais desvantagens a possibilidade de tatuagem temporária da mama (Figura 10), com resolução espontânea podendo variar de dias a vários meses na grande maioria dos casos (VARGHESE *et al.*, 2007); necrose da pele decorrente de injeções subdérmica e reações alérgicas (Figura 11), com casos de anafilaxia descritos (SIMMONS *et al.*, 2003; SALHAB *et al.*, 2005; GOLSHAN; NAKHLIS, 2006; VARGHESE *et al.*, 2007).

Figura 10 - Coloração após administração do corante azul



Fonte: GUMUS et al, 2003.

Na Figura 10, vemos uma coloração persistente da pele após a administração do corante azul patente para BLS da mama. Coloração na pele, em um paciente de 65 anos de idade, coloração azul forte é visível uma semana após injeção do corante azul para BLS.

A incidência de reações anafiláticas com o azul de isossulfan e o azul patente variam de 0,6% e 2,7% em BLS (SCHERER, 2006). Mertes *et al* (2008) reportaram 14 casos clínicos de anafilaxia induzidas por corantes durante os anos de 2004 e 2006 em quatro centros de alergoanestesia na França. Todos os pacientes apresentaram reações de hipersensibilidade ao azul patente durante a BLS em câncer de mama. Nesse estudo, 43% dos pacientes tiveram reações graves (colapso cardiovascular, taquicardia ou bradicardia, arritmias e severo broncoespasmo) e 64% destes necessitaram de infusão prolongada e contínua de epinefrina e transferência para unidades de tratamento intensivo. Wohrl *et al* (2004) descreveram um caso próximo de fatalidade por anafilaxia em decorrência do uso de azul patente em BLS em paciente com melanoma que desenvolveu parada cardíaca que requereu manobras de reanimação cardiovascular depois de injeção intradérmica do corante.

Figura 11 - Presença de numerosas placas no membro inferior após aplicação do corante Azul Patente



Fonte: Maranhão *et al.*, 2016.

2.3.2 Radiofármacos

A utilização do radiocoloide para LS oferece vantagens, pois são eficientemente retidos nos LS, podendo ser utilizados no pré-operatório para identificação da quantidade de linfonodos; localizam linfonodos em locais usuais e não usuais; e anormalidades na drenagem linfática, com a confecção de imagens utilizando a gama câmera; facilita a identificação no intraoperatório, com a utilização do gama-probe pela equipe cirúrgica. Alguns estudos demonstrarem elevadas taxas de identificação, inclusive maiores do que em comparação com o azul patente (MANSEL; GOYAL, 2004).

Existem variações quanto aos diferentes tipos de coloide usados no mundo (dextram, sulfúrico, albumina e antimônio trisulfide), mas o marcador radioativo usado é o tecnécio-99m, que é seguro, meia-vida física de apenas seis horas e viável em qualquer departamento de Medicina Nuclear (MARIANI *et al.*, 2001; PAGANELLI *et al.*, 1998; MARIANI *et al.*, 2001; PAGANELLI *et al.*, 1998).

Os coloides radioativos possuem como desvantagens: alto custo, exige o envolvimento de um médico nuclear e não fornecem, em tempo real, orientação visual.

O Tc 99 tem uma meia-vida de 6 h e a injeção é geralmente realizada por pessoal de Medicina Nuclear e não pelos próprios cirurgiões. Um fator limitante para centros que lidam com o seu isótopo-pai molibdênio-99 (^{99}Mo); este decai tão rapidamente que devem ser fornecidos a serviços de Medicina Nuclear do hospital com a regularidade a cada duas semanas e é produzido em apenas alguns reatores em todo mundo. A oferta também está sujeita a interrupção, remodelação ou comprometimento de instalações nucleares pendentes, como foi demonstrado no desastre nuclear de Fukushima Daiichi, no Japão, em 11 de março de 2011 (MAYES; DOUEK; PANKHURST, 2012).

A utilização de radioisótopos proporciona desafios logísticos para os hospitais. Isso inclui o manuseio e descarte de isótopos, formação de pessoal e nas exigências legais. Adicionalmente, os doentes podem expressar relutância a exposição à radiação especialmente na gravidez (MAYES; DOUEK; PANKHURST, 2012). Esses fatores limitam a disseminação da BLS para hospitais no mundo, sem acesso a radioisótopos. Embora a incidência de câncer esteja aumentando, o número de BLS permaneceu estático, com apenas cerca de 60% dos pacientes no Ocidente, em uma estimativa de meio milhão, teve acesso ao procedimento (RESCIGNO; ZAMPELL; AXELROD, 2009). Esse valor cai para 5% na China e é mínima no resto do mundo (LEONG *et al.*, 2010). Portanto, muitos hospitais estão limitados ao uso, somente, do corante, para executar sua BLS, por causa da falta de acesso aos isótopos radioativos ou recursos insuficientes (AHMED; DOUEK, 2014).

2.3.3 Técnicas combinadas

O emprego das técnicas combinadas, corante e radiofármaco, para identificação do LS, melhorou a taxa de identificação e diminuiu a taxa de falsos negativos na biópsia do LS (CSERNI *et al.*, 2002; MANSEL; GOYAL, 2004). Alguns autores entenderam o uso das duas técnicas como complementares na BLS (ALBERTINI *et al.*, 1996; D'EREDITA *et al.*, 2002).

Trabalhos demonstram a superioridade dos métodos combinados quando comparados a técnicas isoladas. A combinação das duas técnicas, comparadas ao corante isolado, permite um aumento nas taxas de identificação do LS de 0% a 18% (DEROSSIS *et al.*, 2001; EAST *et al.*, 2009). Embora alguns estudos não tenham evidenciado essa vantagem (BLESSING *et al.*, 2002; MORROW *et al.*, 1999;

VARGHESE *et al.*, 2007). Técnicas combinadas, segundo Cody *et al.*, identificam 91% dos casos, com taxas de falsos negativo de 5%. A utilização da técnica combinada do radiocolóide e azul patente é fácil exequibilidade, permitindo identificar localizações não usuais do LS, e diminui da curva de aprendizado nos centros de treinamentos; sendo atualmente a técnica preferida pelos cirurgiões na pesquisa do LS (DEROSSIS *et al.*, 2001, GIULIANO *et al.*, 2000; MCMASTERS *et al.*, 2001; VERONESI *et al.*, 2002).

2.4 Novo marcador autólogo do sangue (hemossiderina)

Os resultados das pesquisas com linfonodos sentinelas são promissoras, porém, a utilização dos seus marcadores possui desvantagens, como exemplo, o alto custo do tecnécio e as reações alérgicas causadas por azul patente. Neste contexto, a prática de marcadores na realização da BLS é foco de muitos estudos e inovações (PINHEIRO *et al.*, 2009; AGUIAR *et al.*, 2017; VASQUES *et al.*, 2016).

Tendo em vista as inovações atuais de marcadores do LS, destaca-se a pesquisa de Pinheiro e colaboradores (2009), na qual, após realização de procedimentos de biopsias mamárias em duas pacientes, foram observados no exame clínico pré-operatório, o mapeamento dos vasos linfáticos com uma coloração avermelhada na mama, em direção ao linfonodo axilar (Figura 12) (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Figura 12 - Pele de paciente no pós-operatório de biópsia de nódulo mamário marcada com derivado de sangue, desenhando o ducto linfático principal da papila em direção a axila



Fonte: Pinheiro, 2009.

Após esta observação, Pinheiro afirmou que um derivado do sangue (hemossiderina) foi capturado por macrófagos e acessou o ducto linfático em direção à axila, onde possivelmente o hemoderivado oriundo do hematoma no sitio cirúrgico, foi capturado por macrófagos do sistema retículo endotelial sendo convertido em hemossiderina que, acessando a rede de drenagem linfática da mama, identificou o ducto linfático da mama até o linfonodo axilar, mecanismo analogamente descrito e conhecido na mobilização de depósitos de ferro dos seres humanos (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2010; CANÇADO; CHIATTONE, 2001).

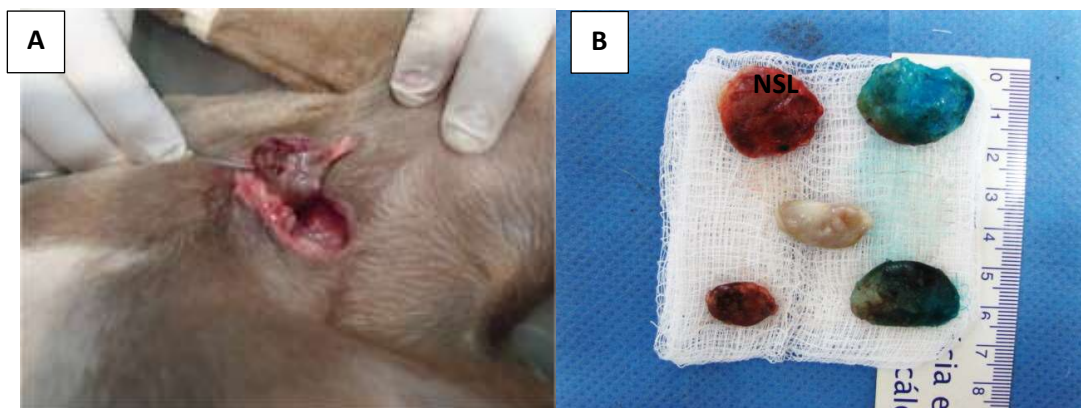
Baseando-se na pesquisa de um modelo animal já estudado, no qual Pinheiro *et al.* (2003) utilizaram na BLS em cadelas os marcadores azul patente e tecnécio, desenvolveu-se um protocolo experimental para a obtenção e aplicação do novo marcador hemossiderina (Figura 12).

2.4.1 Protocolo para utilização da hemossiderina

Com o objetivo de avaliar a utilização da hemossiderina no mapeamento do linfonodo sentinela na mamária das cadelas, foram realizados experimentos

preliminares em 6 cadelas (Figura 12), sendo encontrados dados estatisticamente significativos e consistentes quando comparados o grupo que foi marcado com azul patente/tecnécio versus o grupo submetido ao hemossiderina/tecnécio. A eficácia da BLS com a hemossiderina foi demonstrada por meio da determinação da equivalência da hemossiderina comparada à técnica que utiliza a marcação com o azul patente/Tc 99m, onde observou-se uma detecção semelhante do LS corado com hemossiderina e azul patente/Tc 99m em todos os animais (Figura 12) (Pinheiro *et al.*, 2009).

Figura 13 - Avaliação macroscópica de LS em modelo experimental canino



Fonte: Pinheiro, 2009.

A Figura 13-A contém LS marcado com hemossiderina, *in vivo*, na cadela. E na 13-B, LS, *ex-vivo*, marcado com hemossiderina, azul patente e sem corante (NSL).

Após a identificação do LS em cadelas, usando a hemossiderina como marcador, observou-se uma coloração vermelho escuro/preto do tecido linfóide, que foi confirmada pela identificação de radiação do Tc 99m (PINHEIRO *et al.*, 2009, 2012) sugerindo, assim, um estudo experimental pré-clínico com o novo marcador do LS autólogo do sangue. Tendo em vista o que foi descrito, iniciou-se uma linha de pesquisa para com a hemossiderina, na qual o marcador em questão apresentava como principais vantagens: não ser alergênico, diminuição das despesas pessoais e de saúde, redução da morbidade do procedimento e do sofrimento emocional, juntamente com outras vantagens indiretas (Pinheiro *et al.*, 2009, 2012; VASQUES, 2016).

Logo após a descoberta do novo marcador, observou-se que durante o experimento o animal era sacrificado e o manuseio do sangue dispensava medidas que evitassem a contaminação do derivado sanguíneo. Na perspectiva da utilização experimental do método em humanos, como substituto do azul patente, houve o desenvolvimento de uma técnica asséptica de manipulação do hemoderivado, com o objetivo de prevenir uma provável contaminação do marcador e consequentemente do paciente (PINHEIRO e MAYARA, 2014).

Posteriormente aos estudos preliminares de Pinheiro *et al.* (2009), Vasques *et al.* (2016) e Aguiar *et al.* (2017) propõem avaliar a segurança e a potencial equivalência do uso da hemossiderina na BLS em pacientes com câncer de mama inicial e avançado, respectivamente, utilizando Tc 99m como controle positivo/padrão ouro. Sendo comprovado a eficácia do método por meio da determinação de equivalência, obtendo, assim, resultados semelhantes na detecção do LS corado com hemossiderina e Tc 99m quando comparados com o LS corado com azul patente e Tc 99m. As taxas de identificação do LS foram de 100% (2,5 LS por paciente) e 88,9% (2 LS por paciente) nos estudos de Vasques e Aguiar, respectivamente. Não sendo observados efeitos adversos nos procedimentos com o marcador hemossiderina, tendo este aspecto como principal vantagem quando comparado aos marcadores citados na literatura, pois não produziu reações alérgicas, pigmentações persistentes da pele ou fluidos corporais, ou interferências com oximetria de pulso, e nem casos necrose da pele (VASQUES *et al.*, 2016, AGUIAR *et al.*, 2017).

2.5 Marcador tecidual hemossiderina?

A hemossiderina, um pigmento resultante da degradação da hemoglobina, representa uma das duas principais formas de armazenamento intracelular de ferro. No modelo experimental proposto inicialmente por Pinheiro *et al.*, teoricamente, os macrófagos que compõem o sistema reticuloendotelial fagocitam os eritrócitos lisados, da solução injetada na região subareolar da mama e através da rede linfática da mama, saturam o LS com hemossiderina, alterando a coloração do LS, permitindo sua identificação durante a BLS (PINHEIRO *et al.*, 2009) e quando corado com azul-da-prússia (reação de Perls) reage com ferrocianeto de potássio resultando em um produto de tom azul-esverdeado (ferrocianeto férrico- constituído por Fe^{3+}) (VASQUES, 2016). Vasques *et al.* (2016) e Aguiar *et al.* (2017) afirmam a viabilidade

e aplicabilidade da “hemossiderina” como marcador autólogo na identificação do LS em casos de tumores iniciais e localmente avançado, respectivamente.

Considerando a imprecisão da afirmação de Pinheiro (2009, 2012), Vasques (2016) e Aguiar (2017), que o hemoderivado utilizado como marcador do LS seria a hemossiderina, já que o mesmo não possuía método complexo de preparo e purificação, surgiram alguns questionamentos sobre que ativo era capaz de realizar a marcação tecidual do LS, bem como que elementos do sangue eram responsáveis por esta marcação (1). Tendo em vista o aperfeiçoamento do processo de preparação do novo marcador, surgiram outros questionamentos: (2) seria a concentração de metahemoglobina um fator determinante na marcação? (3) A integridade estrutural das proteínas das hemácias é necessária para a marcação? (4) E como a digestão realizada pelos macrófagos seria efetiva para a marcação.

Julgando a relevância da realização de estudos bioquímicos que otimizassem a utilização deste novo marcador biológico derivado do sangue, potencialmente sem efeitos colaterais e com sensibilidade semelhante aqueles tradicionalmente utilizados na prática da BLS. Neste trabalho buscou-se estudar as características do hemoderivado (hemossiderina), levando ao esclarecimento da principal substância responsável pela marcação do LS e aperfeiçoamento do marcador biológico isolado analisados em paralelo com ensaios pré-clínicos em ratas wistar, através da padronização do seu tempo de drenagem, doseamento, concentração de metahemoglobina e como as enzimas proteolíticas e a temperatura poderiam interferir sobre a marcação tecidual do LS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da hemoglobina como marcador biológico do linfonodo sentinela em ratos wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar as proteínas presentes no concentrado de hemácias após hemólise;
- Purificar proteínas predominantes nas amostras de sangue por cromatografias de alta eficiência;
- Realizar a marcação de linfonodo sentinela com as frações proteicas isoladas por cromatografia;
- Definir o melhor tempo de drenagem e a concentração ideal para uma marcação do linfonodo sentinela satisfatória em modelo animal (ratos wistar);
- Determinar a concentração de metahemoglobina em amostras submetidas a diferentes tempos de contato com indutores de metahemoglobina;
- Analisar processo de marcação do linfonodo sentinela, após proteólise, desnaturação térmica e indução da produção de metahemoglobina na fração rica em hemoglobina;
- Investigar a internalização do marcador proteico (hemoglobina) por macrófagos *in vitro* e *in vivo*.

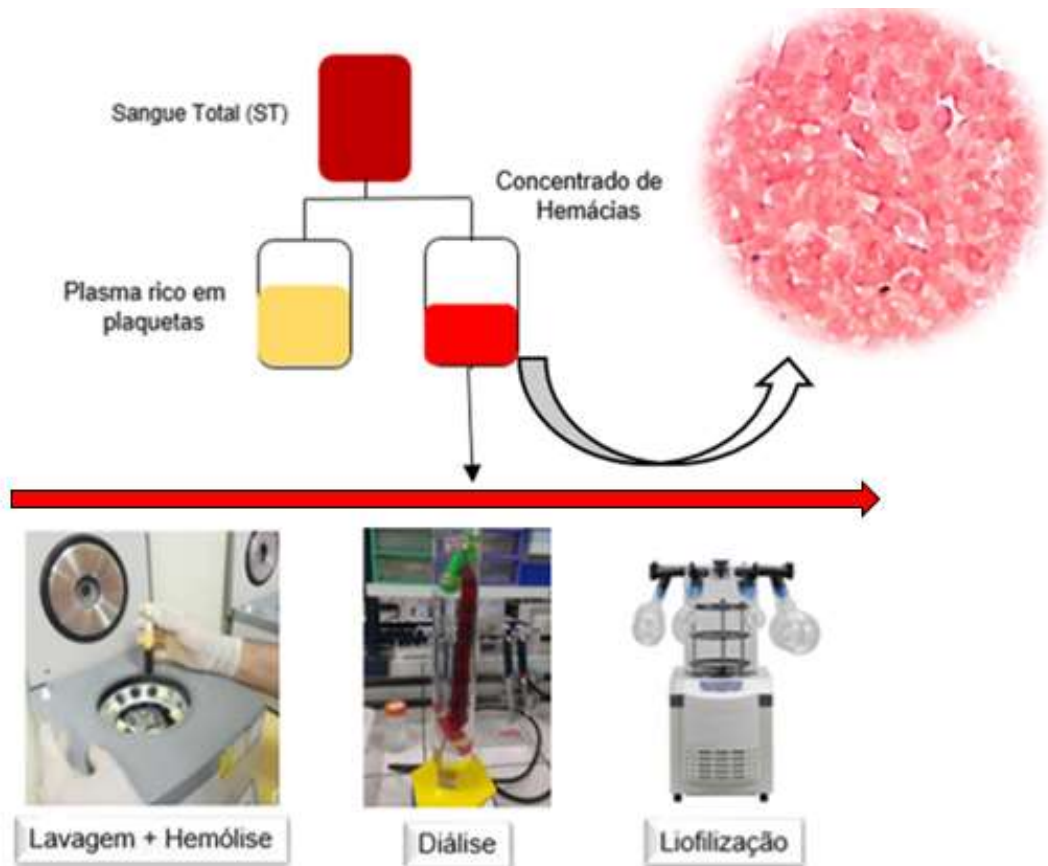
4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do concentrado de hemácias hemolisadas

As bolsas de sangue total foram cedidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), onde a obtenção do concentrado de hemácias lavadas (CH) foi padronizada de acordo com o protocolo de procedimento operacional padrão de preparo de hemocomponentes especiais do hemocentro.

Para obtenção de concentrado de hemácias, foram coletados 50 mL de sangue total de bolsas de sangue, contendo ACD (ácido cítrico, citrato de sódio e dextrose) como anticoagulante. Os glóbulos vermelhos foram inicialmente deixados em repouso por 2 horas em temperatura entre + 20°C a +24 °C para desagregação espontânea das células antes do procedimento de centrifugação. As proteínas plasmáticas e a Hb acelular foram lavadas por ressuspensão das células em 30 mL de solução salina a 0,9%, centrifugando a mistura (4000 rpm, 4 min, 4 °C) e, subsequentemente, descartando o sobrenadante. Este passo de lavagem foi repetido três vezes, obtendo-se o concentrado de hemácias lavados (SAKUMA, OTTOBONI e SIERRA, 2011). Por fim, o concentrado de eritrócitos foi lisado com água ultrapura (Milli-Q) e centrifugado a 9000 rpm por 10 minutos a 4 °C, descartando o pellet formado após a centrifugação. O extrato total (ET) obtido foi dialisado 2 vezes por 24 horas em solução de Tris 20 mM pH 7,2 a 25 °C, liofilizado e armazenado para experimentos posteriores (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma de obtenção do pool de proteínas (extrato total) derivadas do concentrado de hemácias



Fonte: Elaboração da autora.

4.1.1 Controle de qualidade do extrato total

Com o objetivo de avaliar a eficácia da leucorredução e do processo de hemólise e, conseqüentemente, a eficiência da técnica empregada, foram retirados aproximadamente 5 mL do extrato total para a realização dos testes de número de leucócitos residuais, hemoglobina total e grau de hemólise.

A determinação do hematócrito, hemoglobina total, hemoglobina livre e leucócitos residuais foram realizados por hematologistas do HEMOCE, com auxílio do aparelho CELL-DYN Ruby – Fabricado pela Abbott Laboratories®.

A determinação do grau de hemólise do concentrado de hemácias lavadas após lise (CHL), foi executada pela aplicação de fórmula matemática que emprega o

hematócrito do CH, hemoglobina extracelular do CHL e hemoglobina total do CH (SAKUMA, OTTOBONI e SIERRA, 2011):

$$\% \text{ hemólise} = 100 - (\text{Ht} \times \text{Hbe}) \div \text{Hb}$$

Onde:

Ht = hematócrito (%)

Hbe = hemoglobina extracelular (g/dl)

Hb = hemoglobina total (g/dl)

Os parâmetros aceitáveis após a obtenção do concentrado de hemácias lavadas e hemolisadas (extrato total) estão descritos no quadro 4.

Quadro 4 - Parâmetros aceitáveis de obtenção do extrato total

Concentrado de hemácias lavadas e hemolisadas	
Análises	Valores esperados
Hemoglobina total	> 40 g/unid.
Grau de hemólise	> 80% da massa eritrocitária
Leucócitos residuais	< 5,0 x 10 ⁶ /unid.

Fonte: Adaptado de SAKUMA, OTTOBONI e SIERRA, 2011.

4.2 Quantificação de proteínas nas frações obtidas das etapas de purificação

A determinação do conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976). O método de Bradford utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue* BG-250 para a determinação de proteínas totais. O BG-250 interage com proteínas que contenham aminoácidos com cadeias laterais aromáticas ou básicas. No pH da reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente 595 nm. Para a curva padrão, utilizou-se a proteína albumina sérica bovina (BSA). Para a determinação, alíquotas de 100 µL do extrato proteico diluído com 2,5 mL do reagente de Bradford, submetidas a leve agitação e incubados por aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Após isso, as amostras foram lidas a 595 nm e a concentração expressa em mg de proteína por mL.

4.3 Purificação: cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-100

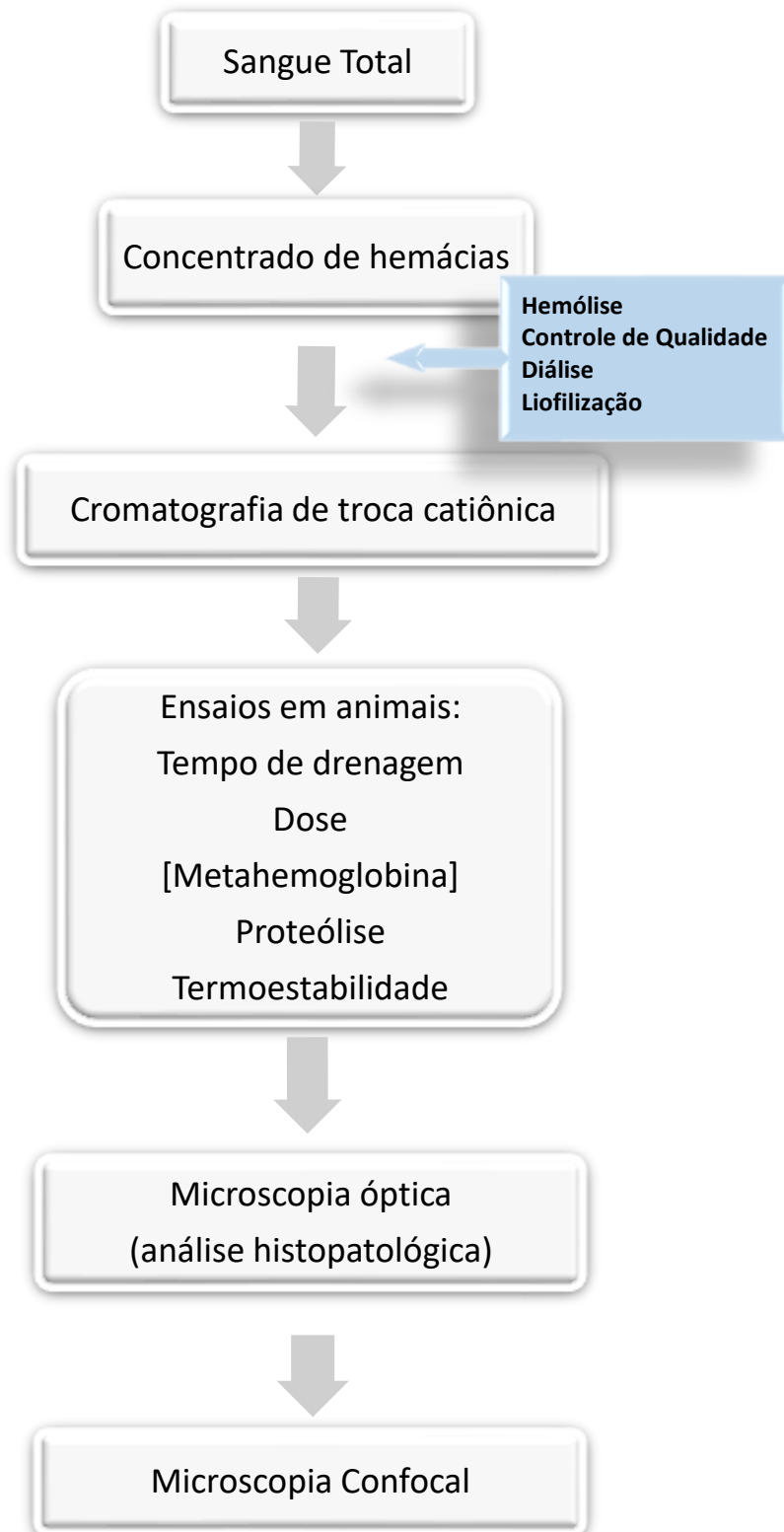
A cromatografia de exclusão foi realizada em bancada seguindo o seguinte protocolo: 4 mg da proteína solubilizada em 1000 µL de tampão AC (Citrato trisódico 22 g/L e ácido cítrico 8 g/L), a 25 °C foram aplicados em coluna de resina Sephadex® 100 (GE Healthcare), 40 x 1 cm, de aproximadamente 30 mL. A coluna já havia sido previamente equilibrada com tampão AC a 0,1M, pH 7,0 de acordo com o protocolo sugerido pela própria empresa (dois volumes de coluna). A eluição foi realizada em fluxo constante de 0,5 mL/min, sendo o processo de cromatografia conduzido em temperatura ambiente e acompanhado por absorção óptica a 280 nm (proteínas totais), 540 nm (hemoglobina) e 630 (metahemoglobina). Todos os tampões foram filtrados em membrana 0,22 µm e desgaseificados antes do uso.

4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para isolamento da proteína de interesse, foi utilizada a coluna de troca catiônica carboximetilcelulose (CM-Celulose) onde as proteínas contidas nas frações coletadas foram monitoradas por absorbância em comprimentos de onda 280 nm. Aplicados 1 mL do extrato total (10 mg/mL) no fluxo de 2 mL/min, eluiu-se em tampão Tris 20 mM pH 7,2 na ausência de sal. Para eluição das proteínas ligadas a matriz cromatográfica foi realizado um gradiente de NaCl variando concentração de 0 a 1 M. As leituras do pico eluído foram realizadas a 280 nm (proteínas totais), 540 nm (hemoglobina) e 630 nm (metahemoglobina).

Após a escolha da cromatografia utilizada para o método de purificação mais eficiente na obtenção do marcador biológico, seguiu-se o fluxograma de estratégia experimental (Figura 15), em que foram realizados ensaios *in vivo* e *in vitro* visando a otimização do concentrado de hemoglobina ([Hb]) como marcador tecidual do linfonodo sentinela.

Figura 15 - Fluxograma da estratégia experimental



Fonte: Elaboração da autora.

4.5 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE)

Para investigar a presença e o grau de pureza do concentrado de hemoglobina e seus derivados, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% em condição desnaturante com uso de dodecil sulfatode sódio (SDS-PAGE), seguindo o método descrito por LAEMMLI (1970), adaptado para o uso de placas de vidro verticais. A revelação das proteínas foi realizada com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,025% em metanol: ácido acético: água (40:10:60, v/v/v), por um período de aproximadamente 2 horas. A revelação foi realizada com a adição de água destilada aquecida a 70°C. Proteínas de massas moleculares conhecidas obtidas comercialmente foram utilizadas como padrões de massa molecular (GE, EUA).

4.6 Eletroforese bidimensional

Os extratos proteicos foram submetidos a eletroforese bidimensional (2D PAGE), combinando a separação baseada no ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão, com a separação por peso molecular em SDS-PAGE na segunda dimensão.

4.6.1 Focalização isoelétrica (primeira dimensão)

Para a primeira dimensão, realizou-se focalização isoelétrica. Alíquotas de 5, 10 e 20 µg de proteína solúvel total foram carregadas diretamente no gel de focalização com gradiente de pH imobilizado, previamente hidratado na faixa de 3 a 10 de 13 cm (Immobiline IPG strips – GE Healthcare), tratando-se de um gel em escala analítica. A focalização das proteínas realizou-se no equipamento IPGphor (GE Healthcare). A tira foi coberta com óleo mineral (Dry Strip Cover Fluid) e, então, a mantivemos a 20 °C por 12 h. Após este período, a IEF foi iniciada ocorrendo em quatro etapas: 500 V/2h, 4000 V/2:30h e 10000 V/18000 Vhr. Após a IEF, as tiras foram imediatamente equilibradas ou armazenadas em freezer -80 °C para posterior utilização.

4.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A segunda dimensão (2-DE/SDS-PAGE) foi realizada com géis de poliacrilamida 12,5% T/2,7% C conforme (LAEMMLI, 1970), cujos tamanhos foram de 160 x 140 x 1 mm, quando analítico e de 200 x 220 x 1,5 mm, quando preparativo. O sistema de eletroforese empregado foi o Ruby (GE Healthcare), correndo simultaneamente quatro géis de 160 x 140 x 1.

4.6.3 Detecção das proteínas em géis bidimensionais e análise de imagem

A detecção das proteínas foi feita através da afinidade das proteínas pela prata ("silver staining"), quando analítico, conforme (Blum *et al.*, 1987), ou (SCHEVCHENKO *et al.*, 1996) e por *Comassie Brilliant Blue*, quando o modo de análise foi preparativo. As análises dos géis bidimensionais foram realizadas através da digitalização das imagens captadas em ImageScanner II (GE Healthcare). Os géis foram comparados e os "spots" de proteína foram seus atributos determinados (massa molecular e pI) com o emprego do Software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare).

4.7 Determinação da concentração de metahemoglobina (MetaHb)

Primeiro, preparou-se tampão fosfato M/60 ph 6.6 diluindo 25 mL da solução tampão M/15 (3,36 g de Na₂HPO₄. 7H₂O; 2,85 g de KH₂PO₄ e 500 mL de água ultrapura – milli-Q) em 75 mL em água ultrapura – milli-Q. Em um tubo de ensaio dilui-se 10 mL do tampão fosfato salino M/60 pH 6,6 com 200 µL do concentrado de hemoglobina com nitrito ([Hb] + Nitrito 3%). A solução foi homogeneizada levemente e deixada em repouso por 2 minutos. Em seguida, foi determinada a leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro a 630 nm (D1: leitura da metahemoglobina em solução). Adicionou-se uma gota de cianeto neutralizado. Essa mistura passou por agitação e repouso por 2 minutos, realizando a leitura da DO em 630 nm (D2: leitura da cianometahemoglobina). Adicionou-se uma gota de ferricianeto de potássio 20% e uma gota de hidróxido de amônio, deixando em repouso por 2 minutos e realizando a DO em 620 nm (D3: leitura da sulfohemoglobina). Transferiu-se 2 mL do tubo, cuja solução foi submetida as três dosagens iniciais, para outro

contendo 8 mL de tampão fosfato M/15, deixando em repouso por 2 minutos e realizando a DO em 540 nm (D4: leitura da oxihemoglobina). O branco foi preparado com 10 mL de água ultrapura (milli-Q), 1 gota de ferricianeto de potássio 20% e 1 gota de cianeto neutralizado. Por fim, foi realizado o cálculo da concentração de metahemoglobina (NAOUM, 2004):

$$\text{Met Hb} = \frac{D1 - D2}{D4} \times 100$$

$$= g\%$$

D1:

Metahemoglobina

D2: Cianometa

hemoglobina

D3:

Sulfohemoglobina

D4:

Oxihemoglobina

4.8 Aplicações biológicas de moléculas

4.8.1 Modelo experimental em animal

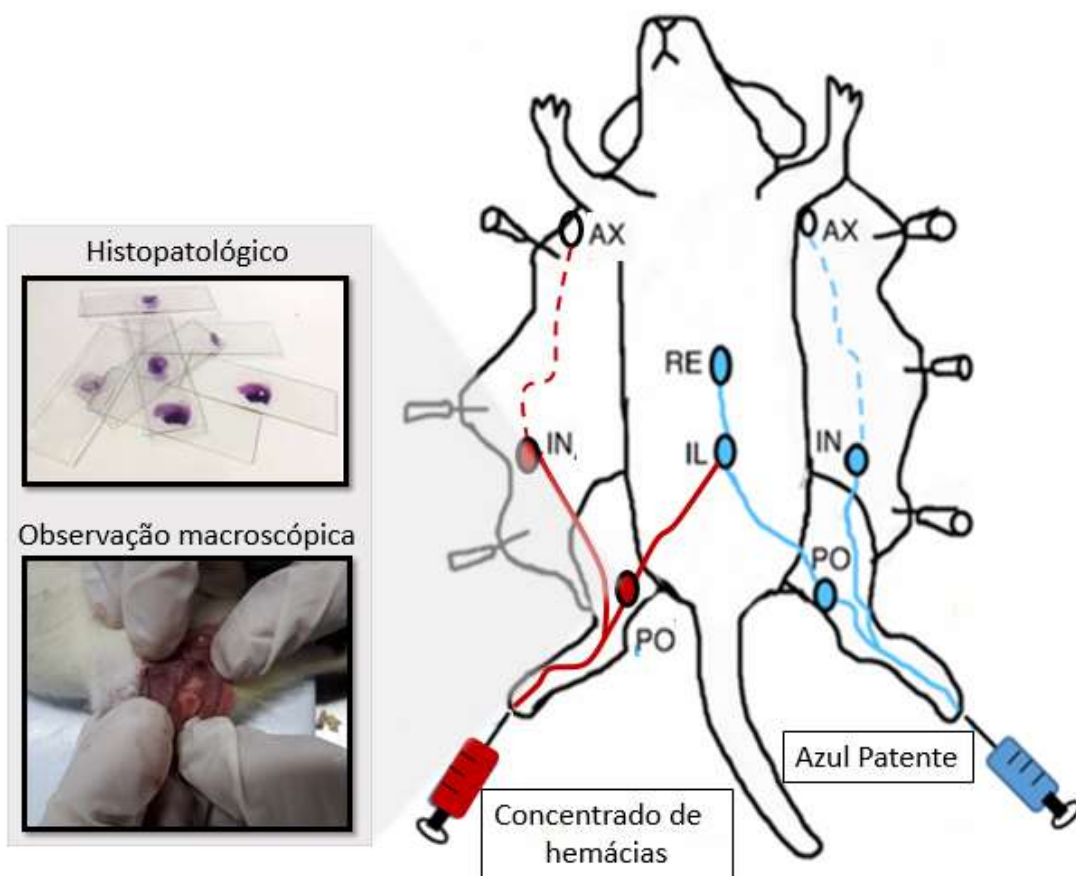
Após a aprovação do estudo experimental cirúrgico prospectivo pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA), protocolo nº46/2016 (ANEXO B). Ratas wistar adultas, com 300 g de peso médio, foram cedidas pelo biotério da Farmacologia – UFC para serem estudadas. Os ensaios com o [Hb] foram realizados em triplicata, sendo executados no Laboratório de Cirurgia Experimental Prof. Saul Goldenberg, a fim de avaliarmos a sua utilização na marcação tecidual do linfonodo sentinela.

Após a padronização do processo de obtenção do [Hb], conforme descrito na seção 4.1, avaliou-se a utilização da fração obtida através do modelo animal adaptado proposto por Oliveira *et al* (2003) e Harrell *et al* (2008), realizando o mapeamento linfático e a identificação do linfonodo sentinela da região poplítea das ratas. Inicialmente, os animais foram devidamente pesados, imobilizados apropriadamente e anestesiados com uma aplicação por via intraperitoneal de quetamina (0,2 mL) e xilazina (0,2 mL) imediatamente antes do teste. Em seguida, injetou-se nas patas posteriores por via subcutânea: 0,5 mL de azul patente (controle positivo) e 1mL (10 mg/mL) da amostra a ser estudada. Posteriormente, foram realizadas incisões em ambas as patas posteriores e região inguinal para observação da coloração dos vasos linfáticos e do linfonodo sentinela, onde ao término da cirurgia, a eutanásia do animal foi realizada através de deslocamento cervical. Esse

procedimento foi utilizado em todos os ensaios, para determinação de variáveis no intuito de otimizar e caracterizar as propriedades da marcação (Figura 16).

Após o procedimento no animal, a drenagem pelos vasos linfáticos e o linfonodo sentinela foram avaliados macroscopicamente pela sua cor e os linfonodos da região poplíteia foram retirados para avaliação histopatológica por microscopia ótica (Figura 16).

Figura 16 - Esquema experimental em animal



Fonte: Adaptado de Harrell, Iritani e Ruddell. Novembro 08, 2008. *Lymph Node Mapping in the Mouse*, p.170-174. *Journal of Immunological Methods*.

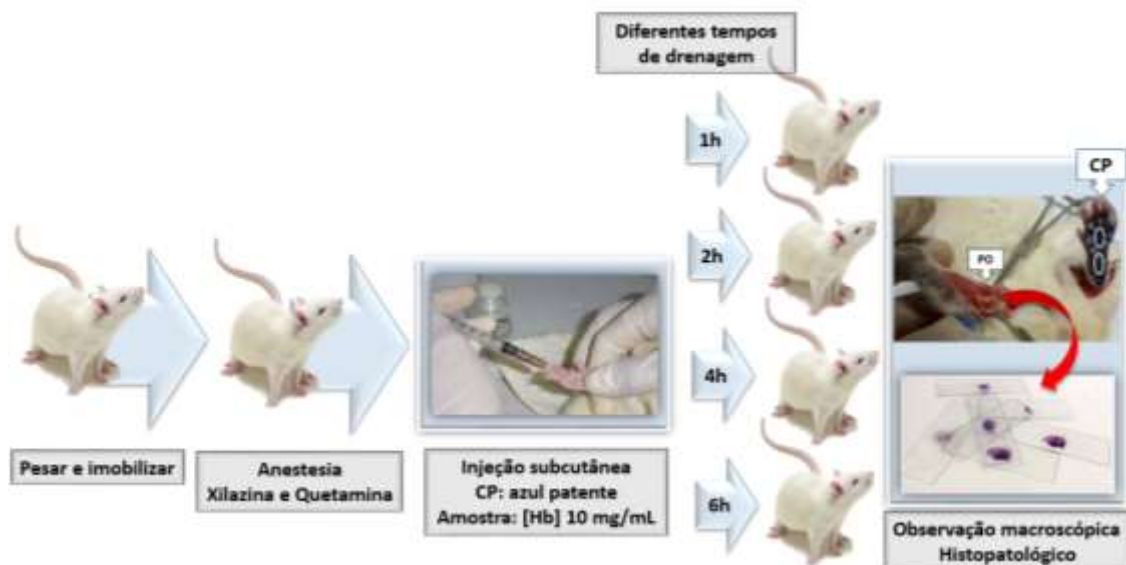
Explicando a Figura 16, Esquema experimental em animal: vasos linfáticos (VL) marcados com marcadores teciduais, azul patente (linha azul) e concentrado de hemoglobina (linha vermelho). Posteriormente a injeção dos corantes nas patas posteriores por via subcutânea, realizou-se a incisão, evidenciando a marcação tecidual do linfonodo poplíteo (observação macroscópica) que foi retirado para avaliação histopatológica. Mapeamento linfático de ratas wistar: Após a injeção de amostra nas patas, a drenagem segue para os linfonodos poplíteos, que drenarão

centralmente para os linfonodos IL e RE ao longo da linha média. Drenando também para o linfonodo inguinal e depois para a linha média. A drenagem do linfonodo inguinal para o linfonodo axilar só é ocasionalmente observada, como indicado pela linha pontilhada. Abreviaturas utilizadas são: AX, linfonodo axilar; IL IN, linfonodo inguinal; PO, linfonodo poplíteo; RE, linfonodo renal.

4.8.2 Determinação do tempo de drenagem do marcador biológico

Após pesar, imobilizar e anestésiar de forma apropriada o animal injetou-se em cada rata 0,5 mL de azul patente (controle positivo) na pata posterior direita e 1 mL (10 mg/mL) de concentrado de hemoglobina na pata posterior esquerda. Após a aplicação, massageou-se o local da injeção por aproximadamente 5 minutos, aguardando a drenagem pelo sistema linfático em tempos diferentes (1 h, 2 h, 4 h e 6 h de drenagem). Transcorridos os tempos de drenagem de cada animal, observou-se macroscopicamente a marcação tecidual dos linfonodos da região poplíteia, estes foram retirados para posterior análise histopatológica (Figura 17).

Figura 17 - Fluxograma do experimento animal para padronização do tempo de drenagem. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; [Hb], concentrado de hemoglobina.

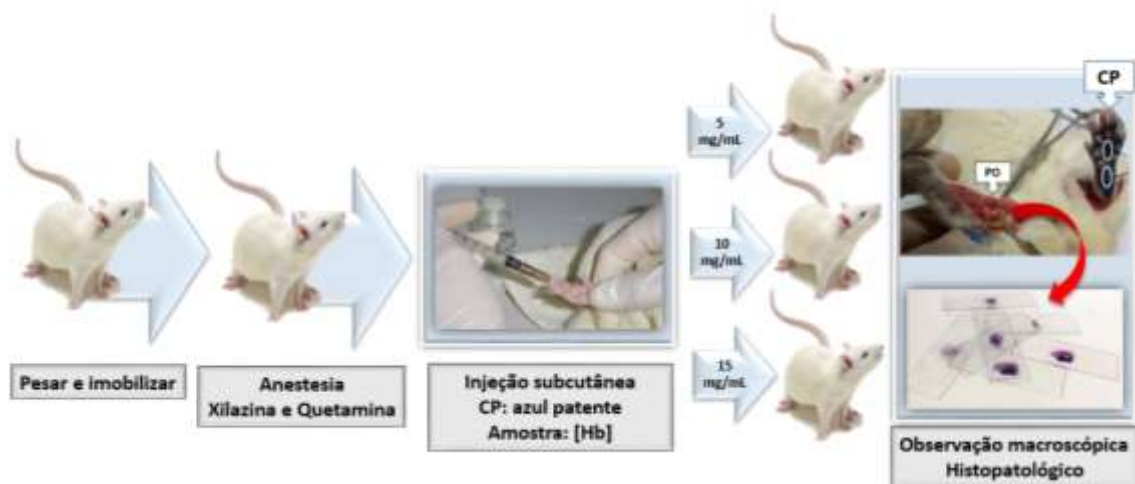


Fonte: Elaboração da autora.

4.8.3 Determinação da concentração padrão do marcador biológico

Após pesar, imobilizar e anestésiar de forma apropriada o animal. Injetou-se em cada rata, primeiramente 0,5 mL de azul patente (controle positivo) na pata posterior direita e 1 mL de [Hb] em diferentes concentrações (5 mg/mL, 10 mg/mL e 15 mg/mL) na pata posterior esquerda. O tempo de drenagem, entre a injeção subcutânea e a incisão para retirada do linfonodo poplíteo, foi de 2 h. Por fim, após a observação macroscópica através da cor dos linfonodos da região poplíteia, que foram retirados para análise histopatológica (Figura 18).

Figura 18 - Fluxograma do experimento animal para padronização da concentração do [Hb]. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; [Hb], concentrado de hemoglobina.



Fonte: Elaboração da autora.

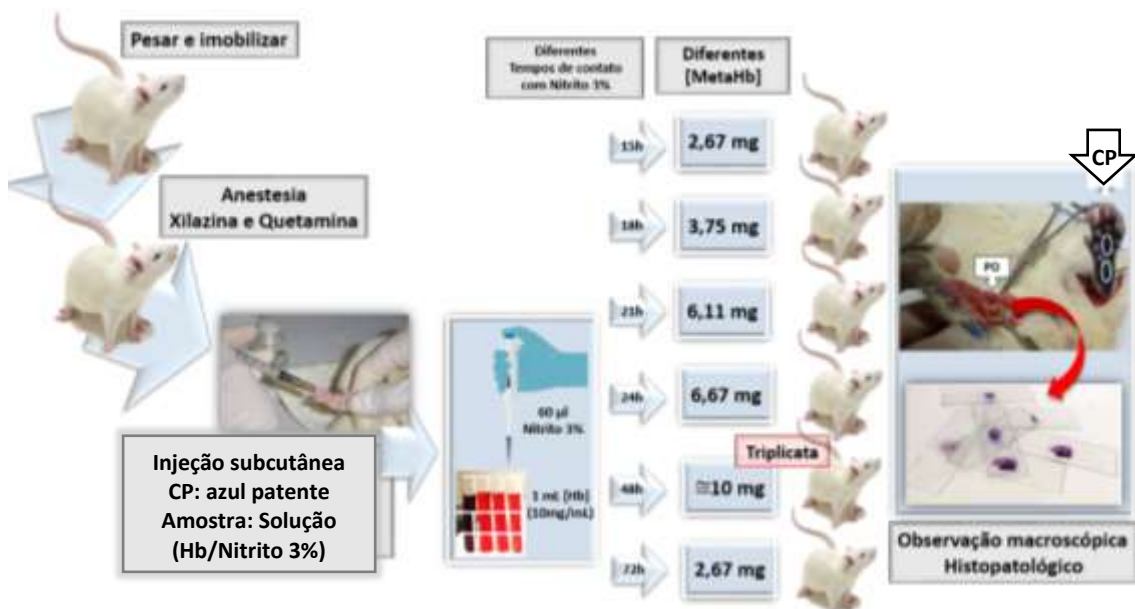
4.8.4 Ensaio para avaliar a relação da marcação tecidual do linfonodo poplíteo com a concentração de metahemoglobina

Preparou a metahemoglobina em concentrações diferentes. Para isso, adicionou-se nitrito a 3% à solução de 10 mg/mL do concentrado de hemoglobina afim de possibilitar o contato por tempos diferentes (15 h, 18 h, 21 h, 24 h, 48 h e 72 h). Depois do tempo de contato, calculou-se as concentrações de metahemoglobina nas soluções preparadas, de acordo com o item 4.7.

Após pesar, imobilizar e anestésiar de forma apropriada o animal. Injetou-se em cada rata, 0,5 mL de azul patente (controle positivo) na pata posterior direita e 1 mL da solução (Hb + Nitrito 3%) na pata posterior esquerda. O tempo de drenagem, entre a injeção subcutânea e a incisão para retirada do linfonodo poplíteo, foi de 2 h. Por fim, após a observação macroscópica através da cor dos linfonodos da região poplíteia, que foram retirados para análise histopatológica (Figura 19).

Figura 19 - Fluxograma do experimento animal para avaliar a relação da marcação tecidual do linfonodo sentinela com diferentes concentrações de metahemoglobina.

Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; Hb, hemoglobina



Fonte: Elaboração da autora.

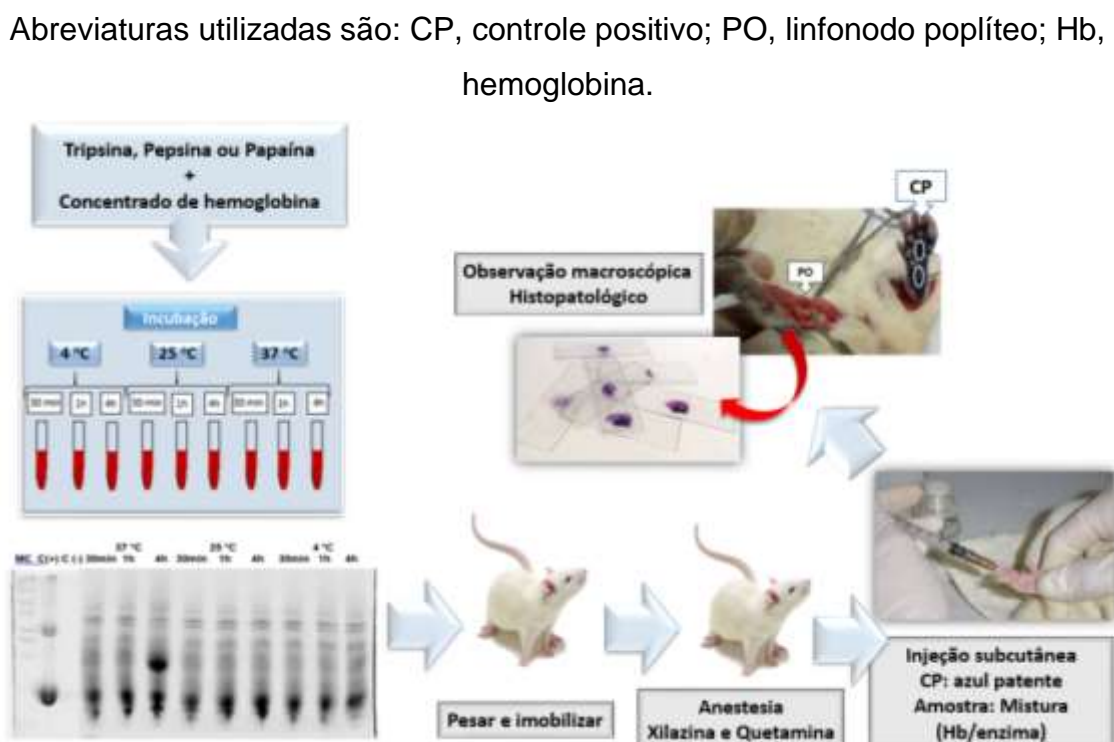
4.8.5 Ensaio para avaliar a marcação tecidual do linfonodo sentinela após proteólise do marcador biológico

A escolha da enzima a ser utilizada para proteólise foi avaliada inicialmente utilizando a fração do concentrado de Hb como substrato e a adição das seguintes enzimas: tripsina, pepsina e papaína com tempo de incubação e temperaturas diferentes, buscando a potencialização da ação da enzima sobre o [Hb].

Soluções do concentrado de Hb (10 mg/mL) foram preparadas em tampão Tris 20 mM pH 7,2. Em seguida, foram transferidos 450 µL de substrato para os 27 eppendorfes e adicionados 50 µL de enzimas (tripsina, papaína e pepsina) a cada grupo teste. Para iniciarem as reações, as amostras foram preincubadas em temperaturas diferentes 4 °C, 25 °C e 37 °C por 30 min, 1 h e 4 h, avaliando, assim, qual temperatura e tempo de incubação seriam ideais para a realização das reações enzimáticas. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados foram avaliados por eletroforese SDS-PAGE.

Depois de analisar a reação enzimática que apresentava um maior número de produtos de degradação, através dos géis eletroforético, realizou-se o ensaio em animal. Após pesar, imobilizar e anestésiar de forma apropriada o animal, a amostra preparada anteriormente ([Hb] + enzima escolhida) foi injetada na pata posterior esquerda do animal, drenando por 2 h, tendo sempre como controle positivo a pata posterior direita, onde injetou-se o azul patente. Por fim, após a observação da marcação tecidual através da cor dos linfonodos, que foram retirados para análise histopatológica (Figura 20).

Figura 20 - Fluxograma do experimento animal para avaliar a relação da marcação tecidual do linfonodo sentinela após proteólise do concentrado de hemoglobina.



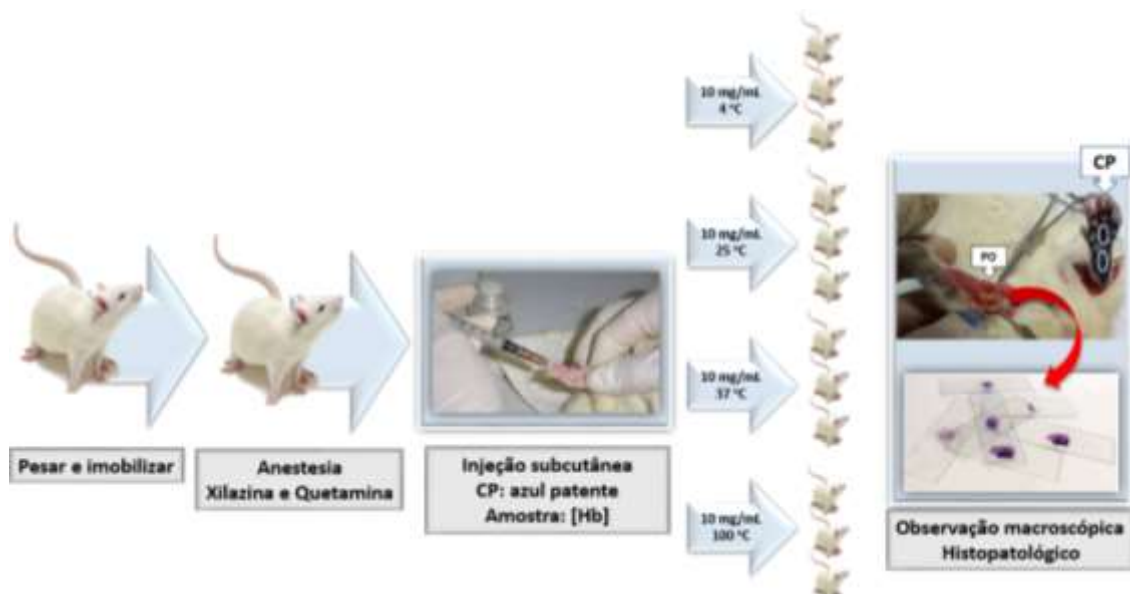
Fonte: Elaboração da autora.

4.8.6 Ensaio para avaliar a marcação tecidual do linfonodo sentinela após ensaio de termoestabilidade do marcador biológico

Primeiro, preparou as amostras a serem injetadas, diluindo 10 mg de concentrado de Hb em 1 mL de água para injeção e expostas a diferentes temperaturas (4°C, 25°C, 37°C e 100°C) por 10 minutos, até a aplicação no animal. Os ensaios de termoestabilidade foram realizados em triplicata, para cada temperatura.

Após pesar, imobilizar e anestésiar de forma apropriada o animal. Injetou-se em cada rata, 0,5 mL de azul patente (controle positivo) na pata posterior direita e 1 mL da solução de [Hb], expostos a temperaturas diferentes, na pata posterior esquerda. O tempo de drenagem, entre a injeção subcutânea e a incisão para retirada do linfonodo poplíteo, foi de 2 h. Por fim, após a observação da marcação visual através da cor dos linfonodos, estes foram retirados para análise histopatológica (Figura 21).

Figura 21 - Fluxograma do experimento animal para avaliar a marcação tecidual do linfonodo sentinela após ensaio de termoestabilidade do marcador biológico. Abreviaturas utilizadas são: CP, controle positivo; PO, linfonodo poplíteo; Hb, hemoglobina.



Fonte: Elaboração da autora.

4.9 Microscopia

4.9.1 Microscopia óptica

A análise histopatológica procedeu-se no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, tendo como colaboradora a patologista Dra. Marcia Pitombeira Ferreira.

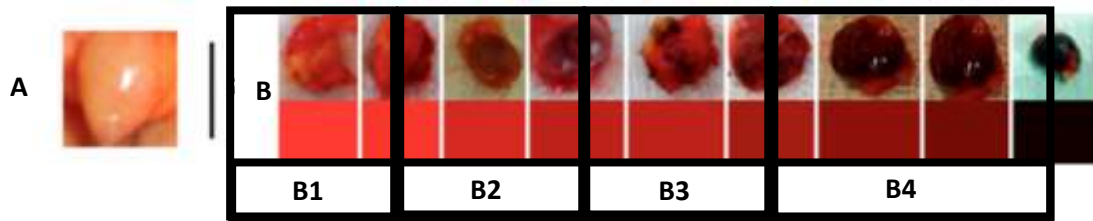
Os linfonodos poplíteos identificados nos animais foram submetidos à dissecação do tecido fibroadiposo circunjacente, com preservação da cápsula linfonodal e em seguida realizou-se a observação dos aspectos do tecido linfoide, medindo cada amostra em três dimensões e as suas colorações. O material foi colocado em solução aquosa de formol tamponado a 10% após a retirada. As peças foram clivadas e reidratadas em soluções aquosas alcoólicas, de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol, embebidas e incluídas em parafina histológica. No exame histopatológico em parafina, cada bloco foi submetido a cortes semi-seriados de 5 µm com três níveis de cortes histológicos. Em cada nível, foram retirados cortes histológicos, corado-os com HE (hematoxi-eosina).

As leituras das lâminas foram realizadas e fotomicrografadas em Microscópio de luz Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc, utilizando o software Zeiss KS 400, os cortes foram analisados pela patologista, nos quais se observou o número de macrófagos contendo vestígios do concentrado de Hb fagocitado. Os casos foram considerados positivos para marcação tecidual do linfonodo poplíteo quando se observou macroscopicamente a presença de uma coloração avermelhada no tecido, sendo confirmada pela visualização de macrófagos no histopatológico.

4.9.1.1 Classificação macroscópica e microscópica

Após observação da coloração tecidual do linfonodo poplíteo *in vivo*, os linfonodos foram classificados de acordo com o aspecto macroscópico proposto por Vasques (2016) adaptado, onde A (não houve marcação/pouca marcação), B1 (marcação regular), B2 (marcação boa), B3 (marcação muito boa) e B4 (marcação ótima) (Figura 22).

Figura 22 - Aspecto macroscópico da cor dos linfonodos

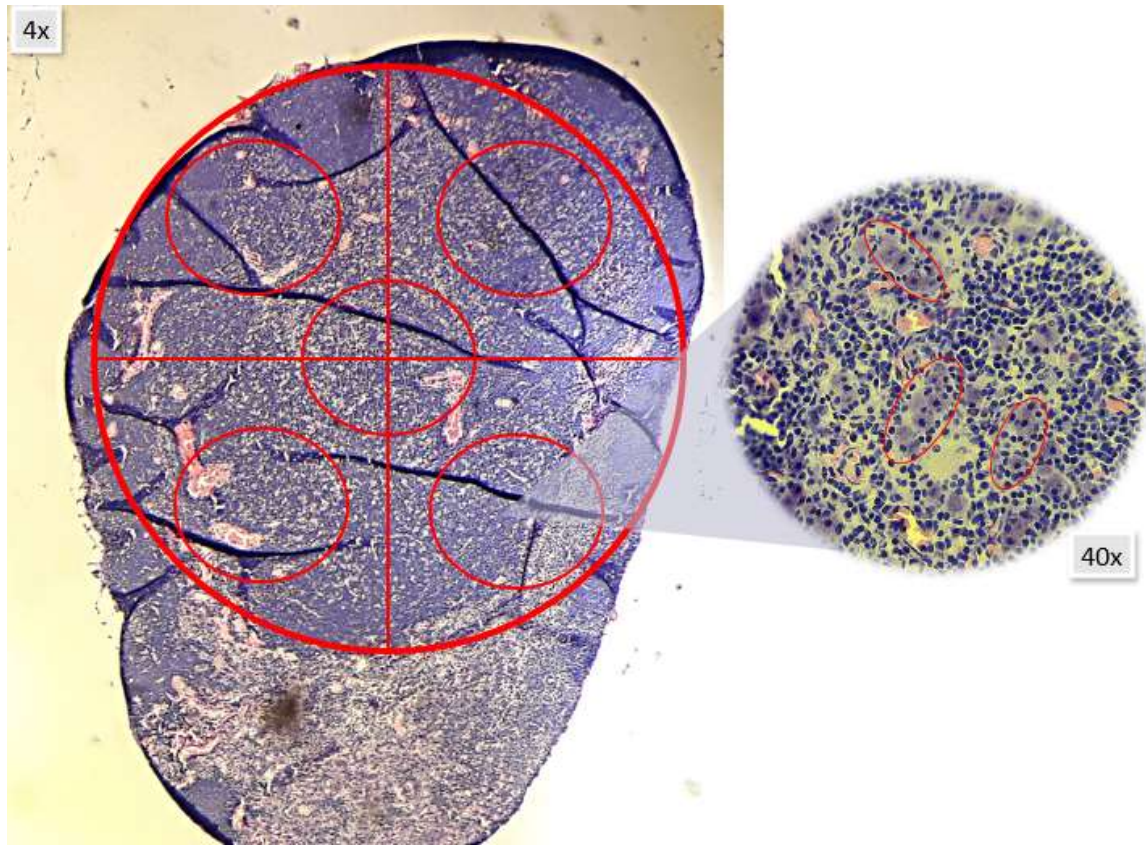


Fonte: Adaptado de Vasques *et al.*, 2016.

Na Figura 22, tem-se o aspecto macroscópico da cor dos linfonodos: (A) Linfonodo sem marcador biológico. (B) Linfonodo corado com marcador biológico ou marcação imperceptível e escala comparativa de intensidade de cor variando de vermelho a preto, sendo subclassificada em marcações: B1 (regular), B2 (boa), B3 (muito boa) e B4 (ótima).

A classificação microscópica dos experimentos em animais foi realizada através da contagem do número de macrófagos com granulações presentes nas lâminas histopatológicas do tecido linfoide. Para isso, analisamos 5 quadrantes de cada lâmina histopatológica (Figura 23), fazendo a contagem dos macrófagos que apresentavam granulações no seu citosol, e, por fim, a média da contagem total de células marcadas, tornando-se possível, assim, demonstrar a relação entre a coloração macroscópica com o número de macrófagos capazes de fagocitar o marcador biológico.

Figura 23 - Classificação microscópica dos experimentos em animais



Fonte: Elaboração da autora.

Após observação com aumento 4x, houve a escolha do quadrante com maior probabilidade de marcação tecidual. Após delimitação da área a ser estudada, foram analisados 5 quadrantes com aumento 40x, onde houve a contagem do número de macrófagos com granulações presentes nas lâminas histopatológicas do tecido linfoide.

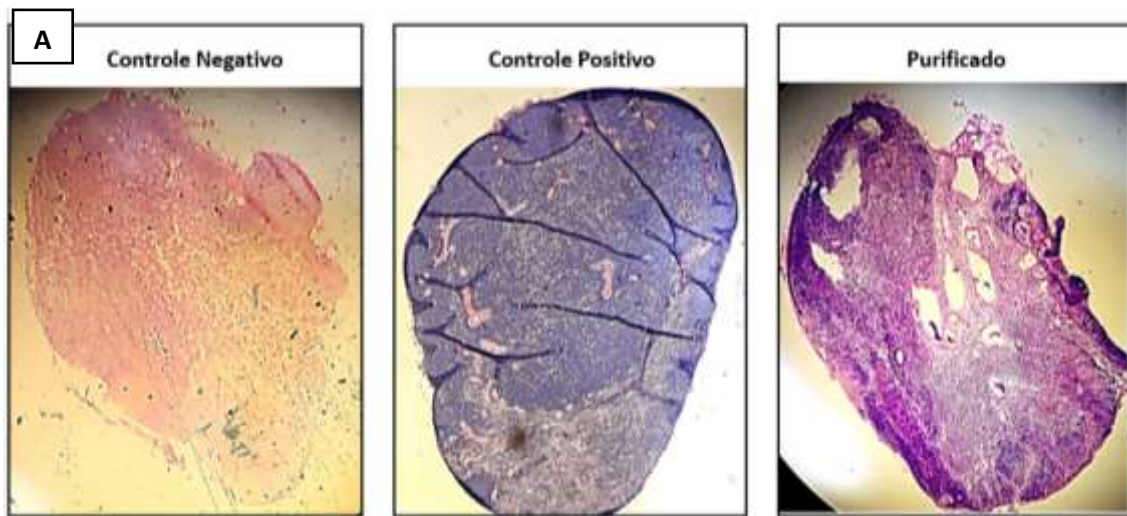
As marcações microscópicas foram classificadas de acordo com a Quadro 5: não houve marcação/pouca marcação; regular, boa, muito boa e ótima. Tendo como parâmetros as micrografias padrões de marcação dos controles positivo (azul patente), negativo (soro fisiológico) e purificado (concentrado de hemoglobina), previamente estabelecidos na figura 24.

Quadro 5 - Classificação da marcação tecidual de acordo com o número de macrófagos com a presença granulações nas lâminas histopatológicas do tecido linfoide

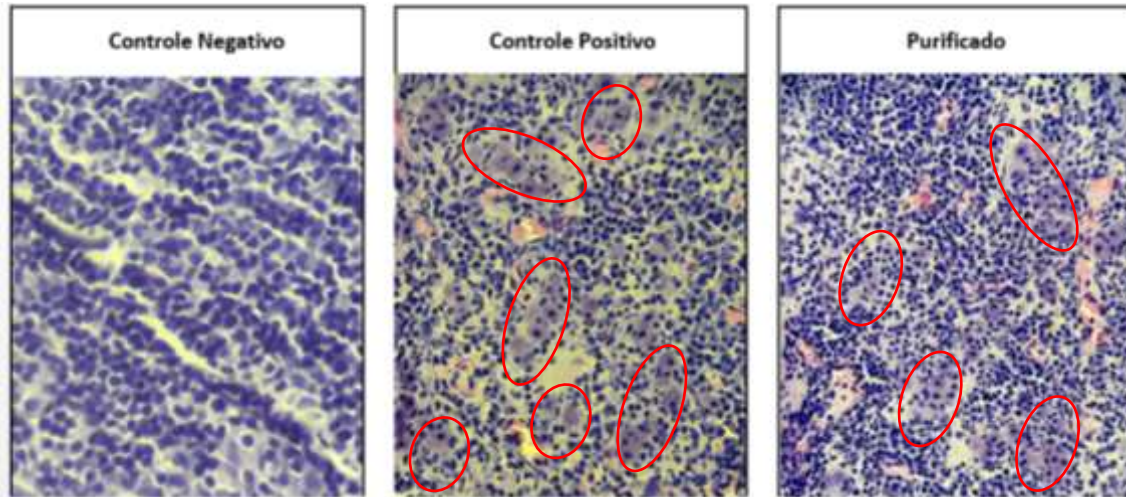
Marcação tecidual	Histopatológico (nº de macrófagos por quadrante)
Não houve marcação / Pouca marcação	0 a 2
Regular	3 a 9
Boa	10 a 19
Muito boa	20 a 29
Ótima	A partir de 30

Fonte: Elaboração da autora.

Figura 24 - Micrografias óticas



B



Fonte: Elaboração da autora.

Na Figura 24, encontramos micrografias óticas, coradas com HE, de padrões de drenagens dos controles positivo (azul patente), negativo (soro fisiológico) e do purificado ([Hb]). (A) Cortes histológicos (4x) de linfonodos sentinelas, onde observa-se a diferença drenagem do marcador biológico quando comparado com os controles, predominando a coloração azul na região onde a linfa é filtrada pelo córtex e entra nos seios medulares. (B) Cortes histológicos (40x) de linfonodos sentinelas, onde observa-se acúmulo dos respectivos corantes no citoplasma de células fagocitárias mononucleares (círculos vermelhos).

4.9.1.1 Análise estatística

As variáveis categóricas foram expostas em frequência e taxa de prevalência de modo a investigar associações, entre a marcação tecidual macroscópica/histopatológica e o concentrado de hemoglobina, do LS. Foram construídos gráficos de dispersão e boxplot para demonstrar o comportamento das variáveis. Para a análise dos dados foram utilizados o software Microsoft Excel e o R 3.4.2.

4.9.2 Microscopia confocal

4.9.2.1 Cultura de macrófagos

Para este estudo, foi utilizada linhagem de macrófagos RAW 264.7 de camundongos, previamente obtida do Banco de células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em criopreservação (nitrogênio líquido) em solução de congelamento composta por meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de Dimetilsulfúrico (DMSO) e 90% de soro bovino fetal (SBF). Para os ensaios de estimulação *in vitro*, as células foram descongeladas a temperatura ambiente e expandidas em dois frascos de cultura celular de 750cm² (Corning Glass Workers-New York-USA) em meio DMEM completo (DMEM-c), à temperatura de 37°C, em estufa incubadora umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

Após formação da monocamada de células, ou seja, após elas atingirem confluência, o meio DMEM-c das garrafas foi descartado com o auxílio de uma pipeta sorológica, sendo os frascos lavados com 20 mL de solução de gentamicina com PBS, a fim de evitar que células mortas fossem plaqueadas. Em seguida, foram adicionados 15 mL de DMEM-c e as células que permaneceram nas superfícies dos frascos foram destacadas por meio de raspagem com suporte plástico. O meio contendo as células foi então retirado e pipetado em dois tubos esterilizados de 50 mL. Os frascos foram centrifugados, a 1500 rpm, durante 10 minutos, para separação das células do meio. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10 mL de DMEM-c foi adicionado em cada um dos tubos contendo as células.

A contagem global de células foi efetuada na câmara de Neubauer, partindo-se de suspensão de 1 mL diluída 10 vezes em solução de Azul de Trypan para avaliação da viabilidade celular e para contagem total do número de macrófagos.

As células foram então colocadas em placas de cultura de 96 poços (Cell Wells – 25820 – Corning Glass Workers – New York – USA), na concentração de 5×10^4 células/poço e incubadas overnight em DMEM-c 37 °C, com 95% de ar e 5% de CO₂.

4.9.2.2 Análise em microscópio confocal

Para o experimento, as células foram plaqueadas em placas de fundo de vidro (P35G-010-C, MatTek Corporation), na concentração de 5×10^4 células/mL e incubadas com 10 mg/mL do concentrado de Hb por 24h.

Após esse período, as células foram lavadas com meio e, em seguida, analisadas em microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss), utilizando objetiva Plan-Apochromat 6x / 1.40 Oil DIC M27 e lasers 405 nm (Em 403 – 490 nm) e 488 nm (em 492 – 630 nm).

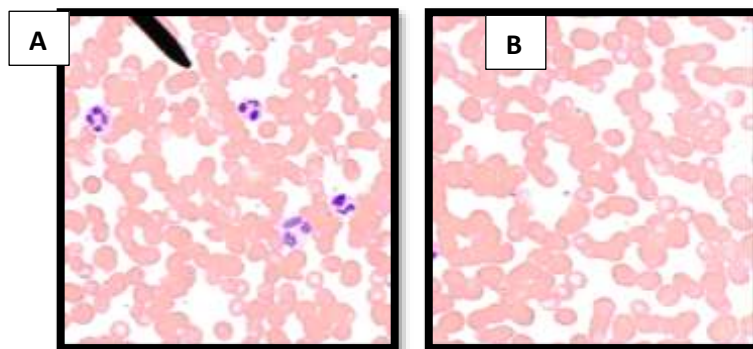
5 RESULTADOS

5.1 Padronização da obtenção do extrato total

A qualidade do extrato total obtido (concentrado de hemácias hemolisadas) foi avaliada qualitativamente, através de micrografias para observação do número de leucócitos residuais e hemácias íntegras após hemólise, e, quantitativamente, através da contagem do número de leucócitos residuais, concentração de hemoglobina total e grau de hemólise.

Após as lavagens com soro fisiológico na preparação do EB, observou-se uma elevada redução dos leucócitos e plaquetas do concentrado de células vermelhas do sangue total. Essa eficiência das lavagens foi bem representada pelas micrografias (Figura 25), que apresentaram redução de contaminantes (células leucocitárias e plaquetas) e confirmada quantitativamente, através do baixo número de leucócitos residuais e alta concentração de hemoglobina total, de acordo com os parâmetros aceitáveis de obtenção do extrato total (Quadro 4).

Figura 25 - Micrografias das células vermelhas antes da hemólise, para avaliação do número de leucócitos antes (A) e após (B) as lavagens com centrifugação

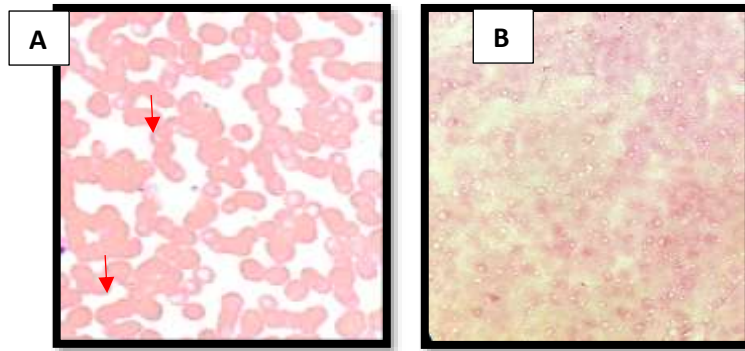


Fonte: Elaboração da autora.

O processo de hemólise foi acompanhado por micrografia e pela determinação do grau de hemólise com auxílio do aparelho CELL-DYN Ruby – Fabricado pela Abbott Laboratories®, sendo possível observar hemácias com membrana celular mais definida quando comparada com o concentrado de hemácias(CH) após hemólise (Figura 26) e diminuição e/ou ausência de células

aparentemente intactas, pois apresentou elevado grau de hemólise, de acordo com os parâmetros aceitáveis de obtenção do extrato total (Quadro 4).

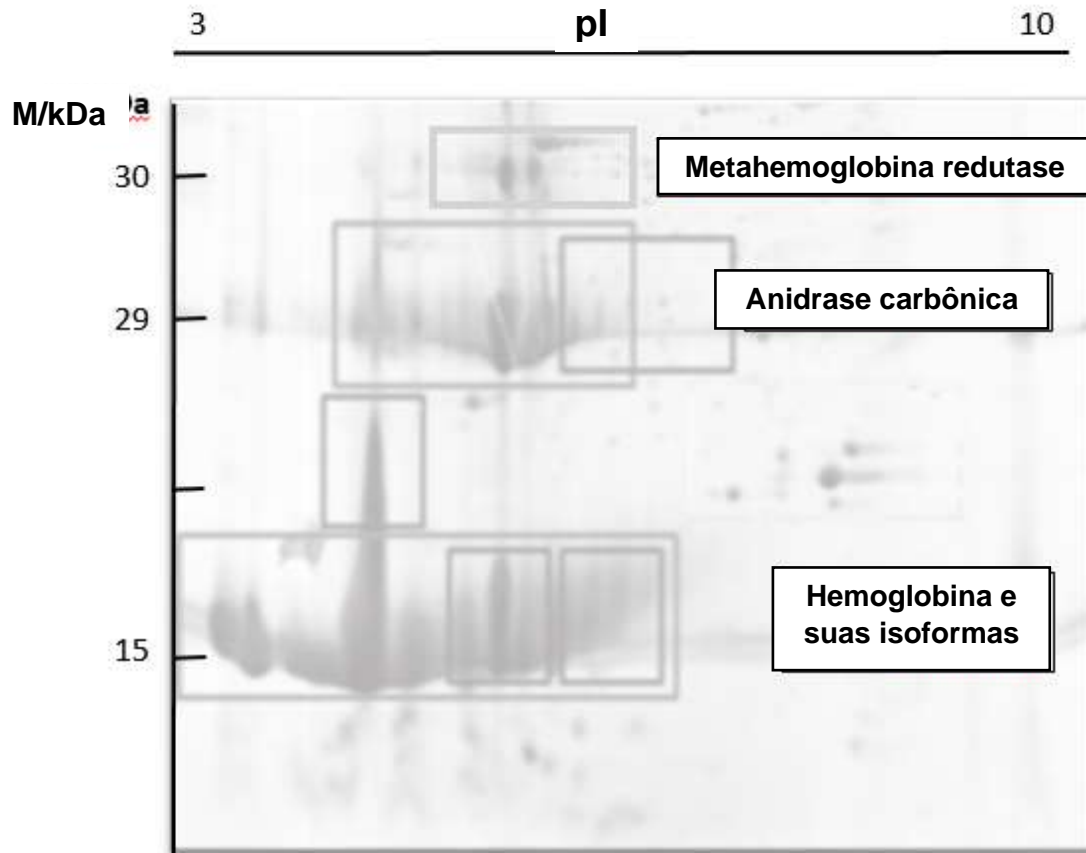
Figura 26 - Micrografias das células vermelhas após as lavagens (A) e do hemolisado obtido com água bidestilada (B)



Fonte: Elaboração da autora.

Além da avaliação qualitativa e quantitativa do extrato bruto, observou-se o alto rendimento na concentração de proteínas totais (1,76 mg/mL), onde a eletroforese deste *pool* de proteínas obtido após hemólise das hemácias em gel 2D de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE) (Figura 27), evidenciou a presença das principais proteínas eritrocitárias: alta concentração de hemoglobina-cadeias alfa e beta (15 e 16 kDa/pI 8,69 e 7,28, respectivamente) e suas isoformas com ampla variação de pI, metahemoglobina redutase (30 kDa/pI 6.8) e anidrase carbônica (29 kDa/pI 6.8).

Figura 27 - Mapa proteômico do extrato total



Fonte: Elaboração da autora.

Podemos observar na Figura 27, o mapa proteômico do extrato total. Gel SDS-PAGE 2-D representativo realizado de proteínas derivadas do concentrado de hemácias após hemólise. Assinalados os spots característicos na presença de metahemoglobina redutase, hemoglobina e anidrase carbônica.

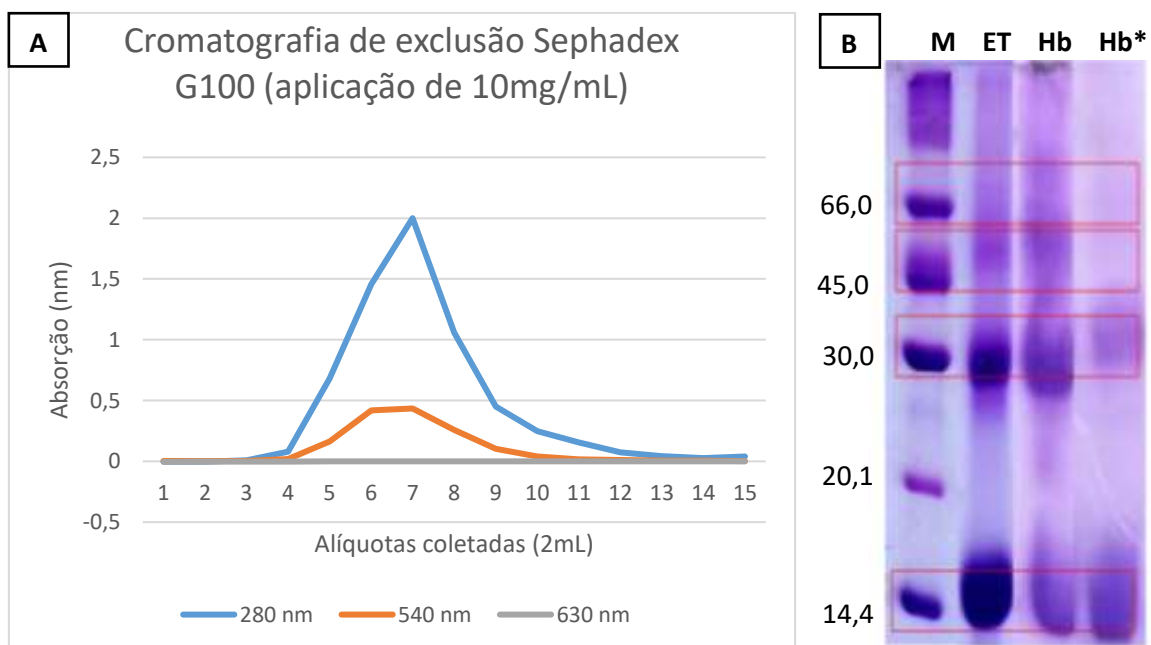
5.2 Purificação

5.2.1 Cromatografia de exclusão em Sephadex G-100

A cromatografia de exclusão em coluna de Sephadex G-100 revelou somente uma fração marjoritária retida (Figura 28A). A fração retida corresponde principalmente à hemoglobina, na qual a eletroforese em gel de poliacrilamida confirma presença de cadeias α e β formando monômeros (15 kDa e 16 kDa, respectivamente)

e dímeros (~ 32 kDa), porém, observa-se a permanência da contaminação por proteínas globulares derivadas da Hb (45 kDa). Após ultrafiltração, ocorre uma redução da contaminação, não sendo observado a presença de proteínas globulares no gel de policramida (Figura 28B). As leituras em espectrofotômetro exibem uma alta absorção de proteínas totais (280 nm), baixa absorção da hemoglobina total (540 nm) e não houve leitura da metahemoglobina (630 nm). Sendo obtido um baixo rendimento (0,140 mg/mL).

Figura 28 - (A) Gráfico da Cromatografia e (B) Perfil eletroforético



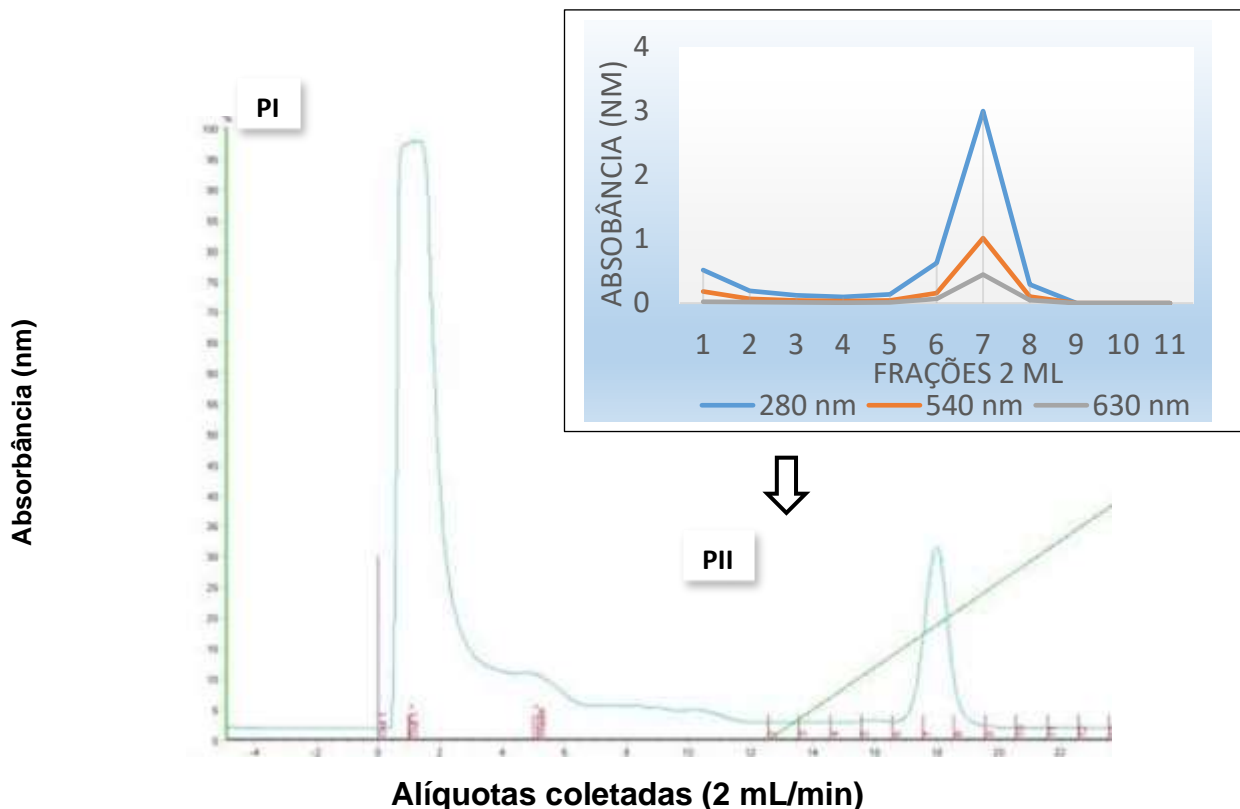
Fonte: Elaboração da autora.

Na Figura 28, tem-se: Gráfico da Cromatografia de exclusão em matriz de Sephadex G-100 (A). 1mL (10 mg/mL) de extrato foi aplicado na matriz cromatográfica. A matriz foi previamente equilibrada com solução AC (Citrato trissódico 22 g/L e Ácido cítrico 8 g/L). Após o contato a o ET, a fração retida foi eluída com AC. Volume da coluna: 30 mL. Volume das frações coletadas: 2 mL. Comprimentos de ondas: 280 nm e 540 nm. (B) Perfil eletroforético de SDS-PAGE a 15% das frações proteicas dos marcadores moleculares, extrato total e fração do concentrado de Hb: com ultrafiltração por centricon (Hb) e com ultrafiltração por centricon (Hb*). Abreviaturas utilizadas são: M, marcadores moleculares; ET, extrato total; Hb, concentrado de hemoglobina sem ultrafiltração e Hb* concentrado de Hb após ultrafiltração.

5.2.2 Cromatografia de troca catiônica no Akta Purifier

A cromatografia de troca iônica em coluna de CM mostrou uma única fração retida. As proteínas que apresentaram a mesma carga do suporte cromatográfico foram eluídas em tampão na ausência de sal. Para eluição das proteínas ligadas à matriz cromatográfica, foi realizado um gradiente de NaCl variando concentração de 0 a 1 M, onde houve eluição da proteína de interesse a 200 μ L de sal. O perfil cromatográfico da CM possui um maior rendimento (0,5278 mg/mL) e maior absorção de proteínas totais (280 nm), hemoglobinas totais (540 nm) e metahemoglobina (630 nm), quando comparado com a cromatografia de exclusão molecular (Figura 29).

Figura 29 - Gráfico da cromatografia de troca catiônica em matriz de celulose



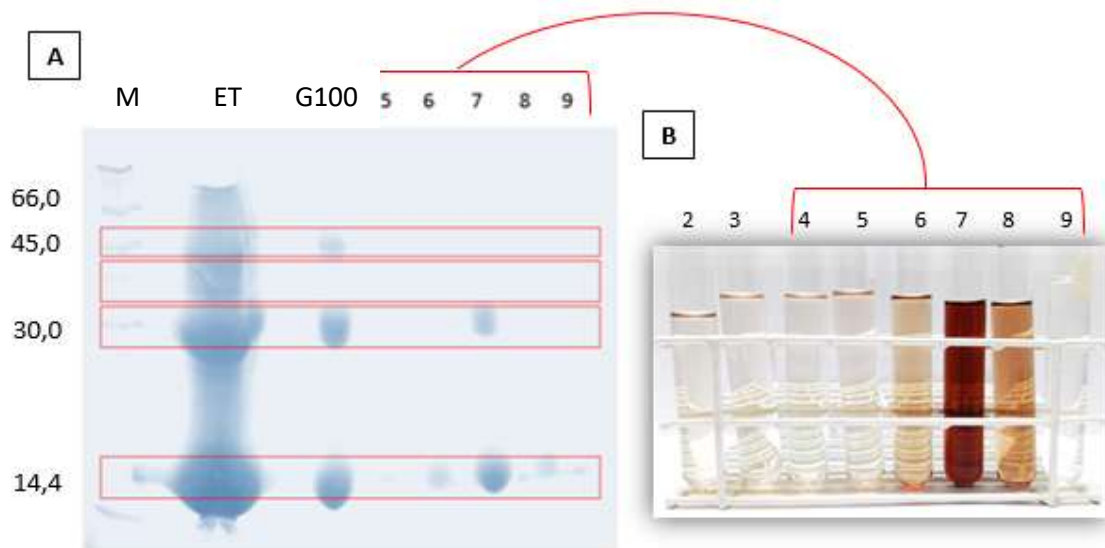
Fonte: Elaboração da autora.

Explicação da Figura 29: Gráfico da cromatografia de troca catiônica em matriz de celulose. 1 mL de extrato total foi aplicado na matriz cromatográfica. A matriz foi previamente equilibrada com Tris 20 mM pH 7,2 obtendo a fração não retida (PI) e a fração PII após a eluição com 200 mM de NaCl. Volume da coluna de 3 mL. Volume

das frações coletadas: 2 mL. Comprimentos de ondas: 280 nm (proteínas totais); 540 nm (hemoglobina) e 630 nm (metahemoglobina).

A fração retida corresponde principalmente à hemoglobina, onde a eletroforese em gel de poliacrilamida confirma presença somente de cadeias α e β formando monômeros (15 kDa e 16 kDa, respectivamente) e dímeros (~ 32 kDa) que constituem a hemoglobina (Figura 30A).

Figura 30 - Perfil eletroforético e alíquotas acumuladas



Fonte: Elaboração da autora.

Explicando a Figura 30: (A) Perfil eletroforético de SDS-PAGE a 15% das frações proteicas dos marcadores massa molecular, extrato total e fração do concentrado de Hb após cromatografia de exclusão (G 100) e após cromatografia catiônica CM (5,6,7,8,9). Abreviaturas utilizadas são: M, marcadores moleculares; ET, extrato total; G100, fração de concentrado de hemoglobina após cromatografia de exclusão e 5,6,7,8,9, alíquotas da fração PII do concentrado de hemoglobina após cromatografia catiônica. (B) Alíquotas acumuladas da fração PII do concentrado de hemoglobina após cromatografia catiônica, onde observa-se o aumento e a diminuição da coloração vermelha da solução proporcional a curva cromatográfica.

5.3 Aplicações de marcador biológico in vivo

5.3.1 Modelo experimental em animal

A formação de pápulas, após aplicação subcutânea do azul patente (controle positivo) e do concentrado de Hb, nas patas posteriores de cada animal estudado, demonstra que a injeção foi realizada de forma satisfatória. O desaparecimento gradual dessas pápulas evidencia que as substâncias administradas foram drenadas por vasos linfáticos localizados na espessura da derme até a chegada do linfonodo poplíteo, simulando, portanto, a mesma drenagem linfática dos tumores de pele metastáticos e, conseqüentemente, a drenagem dos corantes utilizados na busca da determinação do LS (Figura 16).

Foi observado o LS poplíteo através da coloração azulada e com pontos amarronzados, devida a presença dos corantes azul patente e o concentrado de Hb, respectivamente, demonstrando que houve circulação linfática efetiva durante o período decorrente desde a aplicação do corante até a dissecação do LS. Através da dissecação do linfonodo poplíteo, foram realizados cortes histológicos nos quais avaliou-se a presença das substâncias estudadas fagocitadas pelos macrófagos através da drenagem linfática.

5.3.2 Determinação do tempo de drenagem no linfonodo sentinela


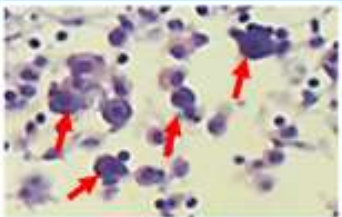

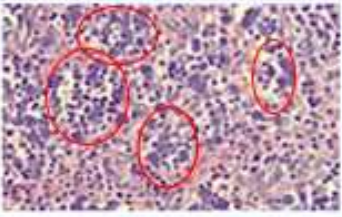

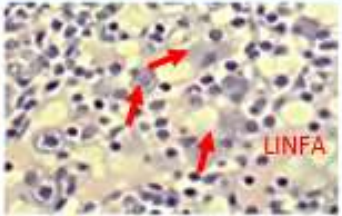
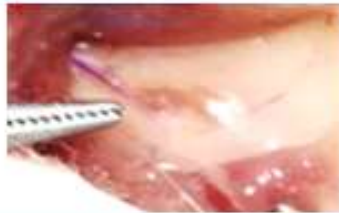
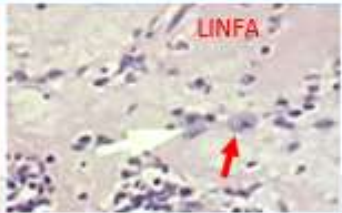
Após a aplicação de 0,5 mL de azul patente e 1 mL do concentrado de hemoglobina, drenando por tempos diferentes (1 h, 2 h, 4 h e 6 h), observou-se que 2h seria o tempo ideal de drenagem entre o sítio de injeção e o LS da fossa poplíteia, apresentando uma marcação tecidual mais evidente (Figura 31) e um aumento do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma (Figura 31 e Gráfico 01).

Macroscopicamente, os tempos de drenagem de 1 h e 2 h, aparentemente, apresentam a mesma marcação macroscópica, o que não é confirmado quando comparamos os seus histopatológicos, onde a drenagem por 2 h possui um maior número de macrófagos com citosol marcado (Figura 31).

Após a drenagem do concentrado de Hb por 4h e 6h, observou-se uma diminuição gradual da marcação tecidual macroscópica, assim como uma diminuição

do número de aglomerados de macrófagos com presença de [Hb] em seu citosol e aumento de linfa nos seios capsulares (Figuras 31 e Gráfico 01).

Figura 31 - Ensaio *in vivo* do tempo de drenagem para linfonodo sentinela da região poplítea

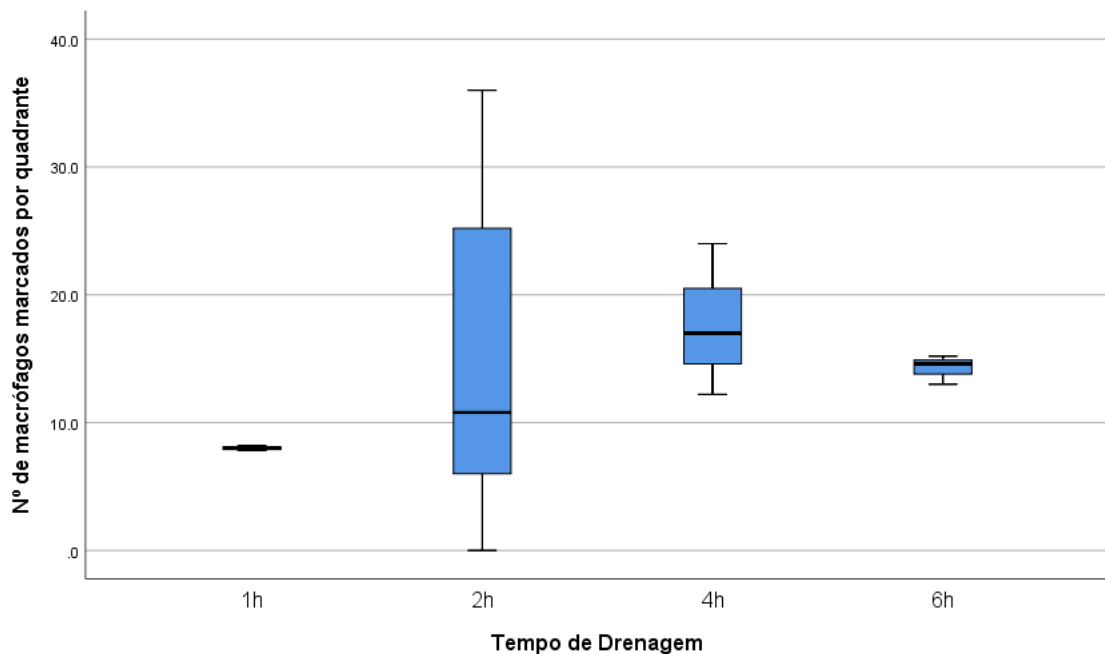
Tempo de drenagem	Marcação macroscópica por [Hb]	Cortes histopatológicos
1h		
2h		
4h		
6h		

Fonte: Elaboração da autora.

Na Figura 31, observam-se ensaios *in vivo* do tempo de drenagem para linfonodo sentinela da região poplítea. Injeção de 1 mL do purificado e 0,5 mL de azul patente (controle positivo) em cada pata posterior, respectivamente. Visão macroscópica e histopatológica do linfonodo poplíteo apresentam marcação tecidual satisfatória, após aplicação do [Hb] drenar por 2 h. Havendo marcação macroscópica bastante satisfatória com 1 h, mas, quando comparado com os histopatológicos de 2 h

de drenagem, possui um menor número de macrófagos marcados. Além disso, observa-se diminuição na marcação tecidual do tecido linfóide, com o aumento do tempo de drenagem, sendo reafirmado nos cortes histopatológicos com a presença de seios subcapsulares apresentando elevada concentração de macrófagos marcados com 2 h de drenagem (muito boa), diminuindo com o aumento do tempo de drenagem: 4 h (boa) e 6 h (regular).

Gráfico 1 - Relevância estatística do número de macrófagos



Fonte: Elaboração da autora.

Percebe-se, no Gráfico 01, a relevância estatística do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma, drenados em diferentes tempos (1 h, 2 h, 4 h e 6 h), em que 2 h de drenagem possui maior marcação tecidual macroscópica e maior número de macrófagos marcados.

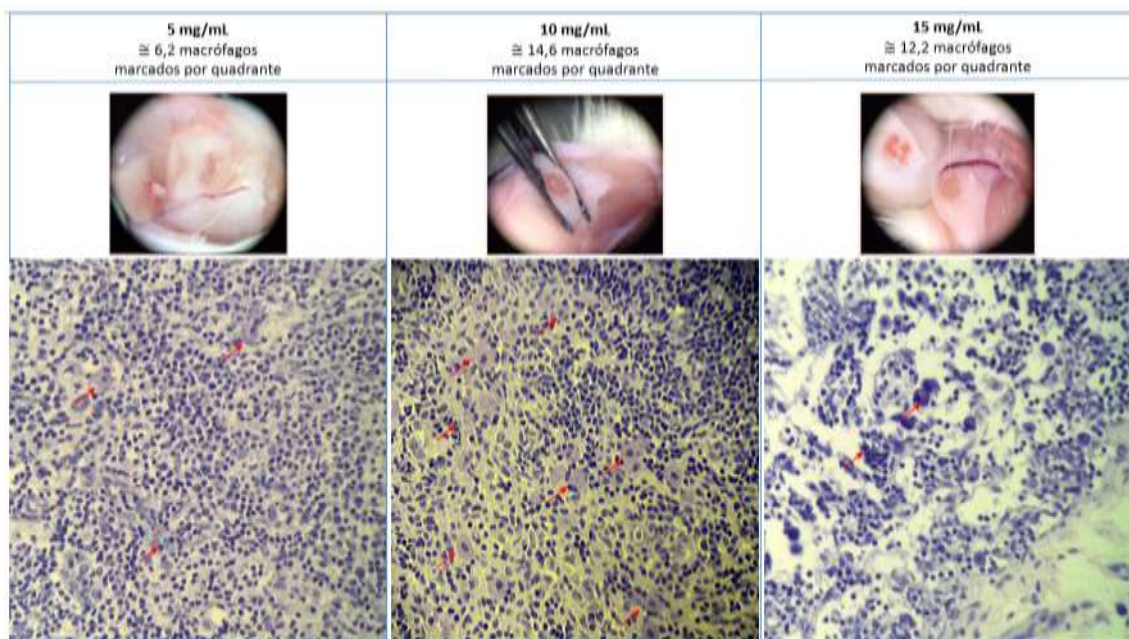
5.3.3 Determinação da concentração padrão para marcação tecidual do linfonodo sentinela

Com o objetivo de avaliar o limiar de saturação do tecido linfóide para uma marcação mais eficiente em ensaio animal, injetou-se 0,5 mL de azul patente (controle positivo) e 1 mL da amostra estudada em concentrações diferentes (5, 10 e 15

mg/mL), respeitado o tempo de drenagem de 2h até a dissecação do linfonodo poplíteo (Figura 32).

Após serem observadas as marcações macroscópicas dos LP: 5 mg/mL (regular), 10 mg/mL (muito boa) e 15 mg/mL (boa) e as marcações histopatológicas: 5 mg/mL (6,2 macrófagos por campo), 10 mg/mL (14,6 macrófagos por campo) e 15 mg/mL (12,2 macrófagos por campo), determinou-se que a concentração padrão seria a injeção de 10 mg/mL do concentrado de Hb, em que foi observada uma melhor marcação macroscópica e a presença de um maior número de macrófagos com vestígios de [Hb] no seu citoplasma (Figura 32 e Gráfico 02).

Figura 32 - Ensaios *in vivo* com intuito de avaliar a concentração padrão para marcação tecidual do linfonodo da região poplítea

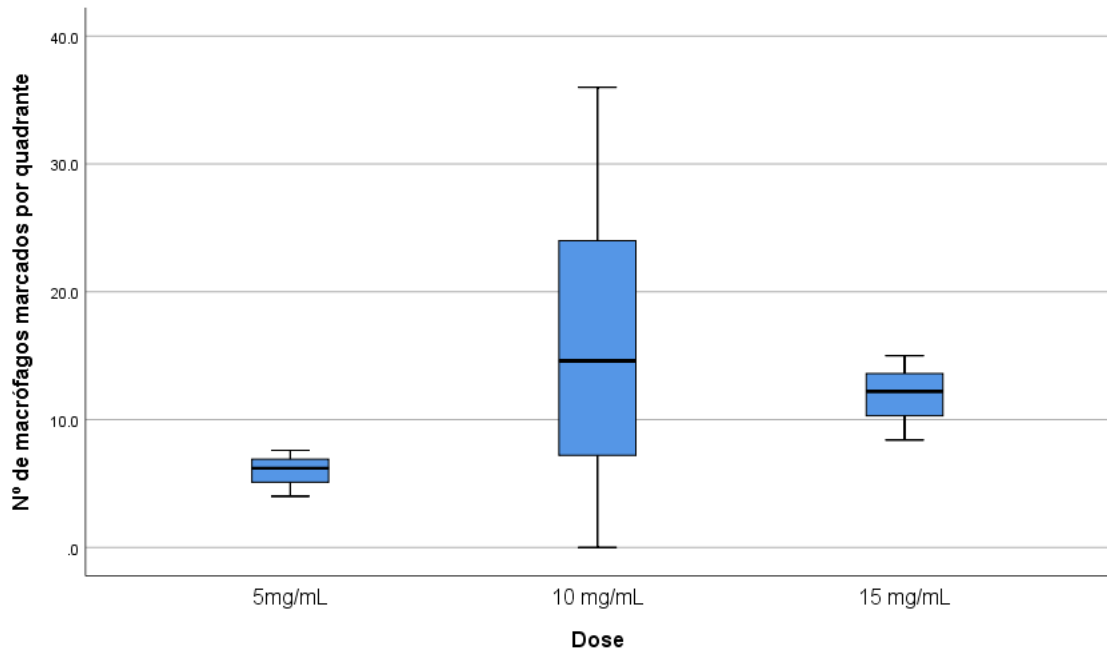


Fonte: Elaboração da autora.

Na Figura 32, temos ensaios *in vivo* com intuito de avaliar a concentração padrão para marcação tecidual do linfonodo da região poplítea. Injeção de 1 mL do purificado e 0,5 mL de azul patente (controle positivo) em cada pata posterior, respectivamente. Visão macroscópica e histopatológica (40 x) do linfonodo poplíteo apresentam marcação tecidual mais efetiva, após aplicação de 10 mg/mL do [Hb], drenado por 2 h. Observa-se diminuição na marcação tecidual do tecido linfóide, nas concentrações de 5 mg/mL e 15 mg/mL, quando comparado com 10 mg/mL, sendo

reafirmado nos cortes histopatológicos com a presença de seios subcapsulares apresentando baixa concentração de macrófagos marcados com [Hb].

Gráfico 2 - Relevância estatística do número de macrófagos



Fonte: Elaboração da autora.

No Gráfico 2, observa-se a relevância estatística do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma, drenados por 2h, em diferentes concentrações (5 mg/mL, 10 mg/mL e 15 mg/mL), onde a concentração de 10 mg/mL possui maior número de macrófagos marcados.

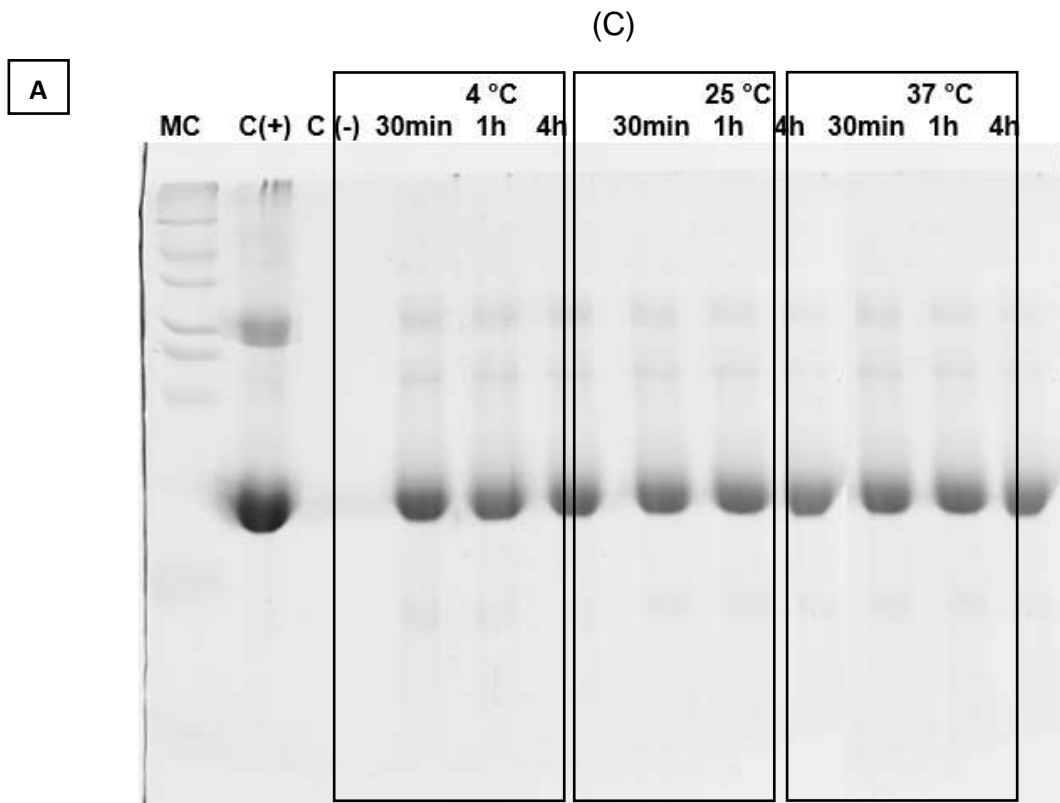
5.3.4 Atividade da fração isolada após proteólise

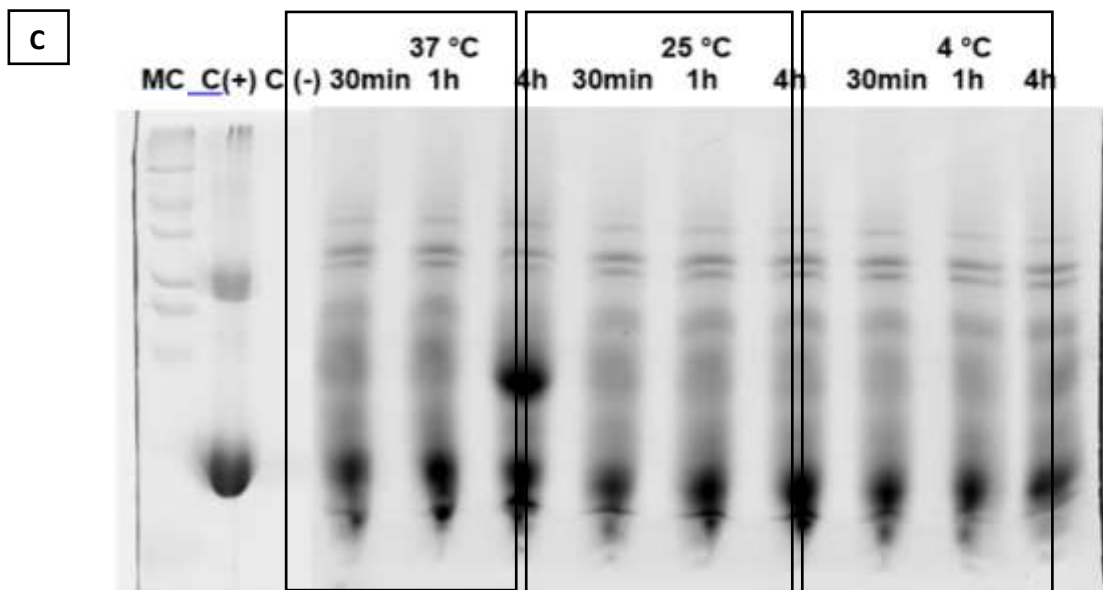
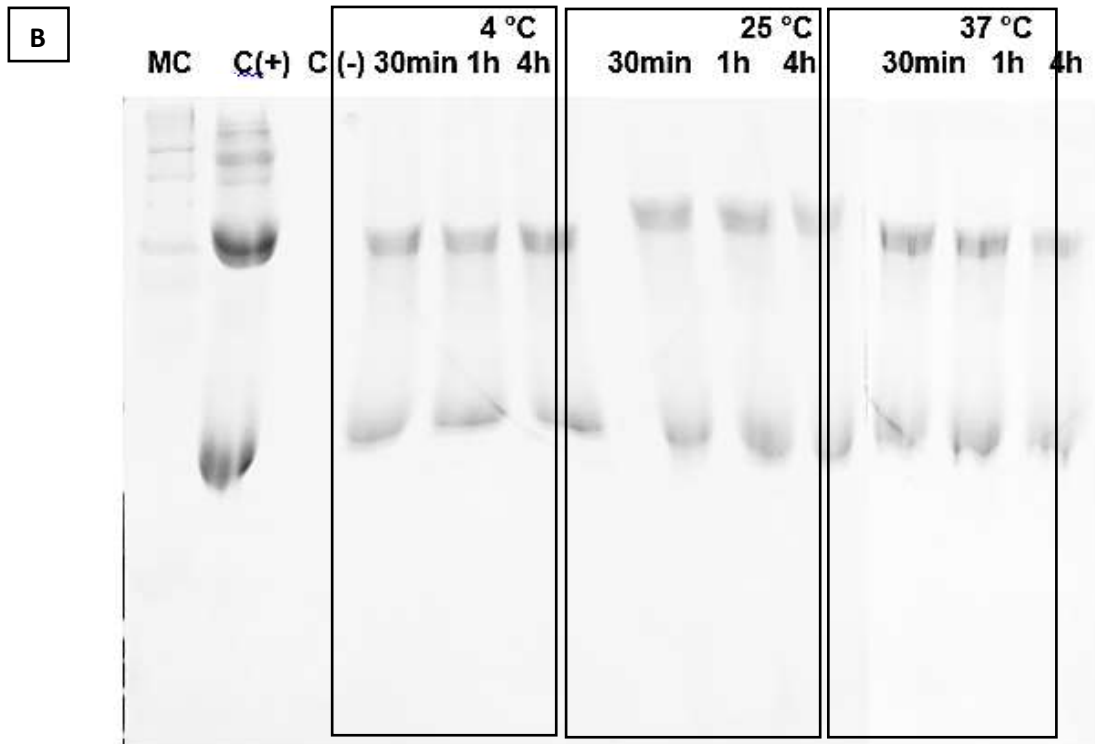
Buscando a utilização de uma enzima otimizada para ser empregada na degradação total da Hb através de clivagem das suas ligações peptídicas, realizou-se alguns ensaios utilizando o concentrado de Hb como substrato e a adição das seguintes enzimas: tripsina, pepsina e papaína em temperaturas diferentes (4°C e 25°C, 37°C) para cada tempo de incubação (30 min, 1 h e 4 h), avaliando, assim, qual temperatura e tempo de incubação seriam ideais para a realização das reações enzimáticas. Por fim, os resultados foram avaliados por eletroforese (Figura 33 A, B e C).

Após analisar as reações enzimáticas nos tempos de incubação e temperaturas ideais para cada enzima, observou-se um maior número de produtos de degradação da Hb após a reação de catálise da enzima tripsina incubada a 37°C por 4 h (Figura 33 C). Sendo assim, a tripsina foi selecionada para a realização do ensaio em animal, buscando, assim, avaliar a necessidade da integridade proteica da Hb na marcação tecidual do linfonodo sentinela.

No ensaio animal, primeiramente foram realizados a pesagem, imobilização e anestesia de forma apropriada da rata wistar, na qual injetou-se a amostra (tripsina + [Hb]), drenando por 2 h até a incisão para retirada do linfonodo poplíteo, tendo sempre como controle positivo a outra pata posterior, em que se injetava o azul patente. Por fim, observou-se a ausência de marcação tecidual e de macrófagos com vestígios da amostra e presença de vacúolos no seu citoplasma (Figura 34).

Figura 33 - Perfil proteico das seguintes enzimas: pepsina (A); papaína (B) e tripsina

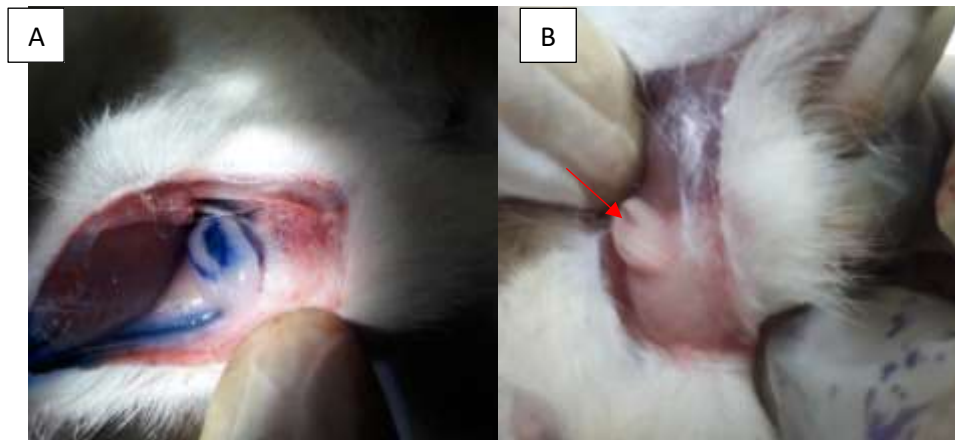




Fonte: Elaboração da autora.

A Figura 33 traz o perfil proteico das seguintes enzimas: pepsina (A); papaína (B) e tripsina (C), em que as enzimas foram preincubadas com a amostra purificada por 30 min, 1h e 4h em temperaturas diferentes 4 °C, 25 °C e 37 °C. Abreviaturas utilizadas são: MC, marcadores moleculares; C (+), controle positivo/concentrado de Hb; C (-), controle negativo/enzima.

Figura 34 - Ensaio *in vivo* utilizando o concentrado de Hb após proteólise como o marcador tecidual



Fonte: Elaboração da autora.

Na Figura 34, encontram-se o ensaio *in vivo* utilizando o concentrado de Hb após proteólise como o marcador tecidual. Injeção de (A) 0,5 mL de azul patente (controle positivo) e (B) 1 mL da amostra ([Hb] + tripsina) nas patas posteriores, respectivamente, drenando para linfonodos da região poplítea. Foi observado que não houve marcação tecidual após a utilização de enzima no concentrado de Hb.

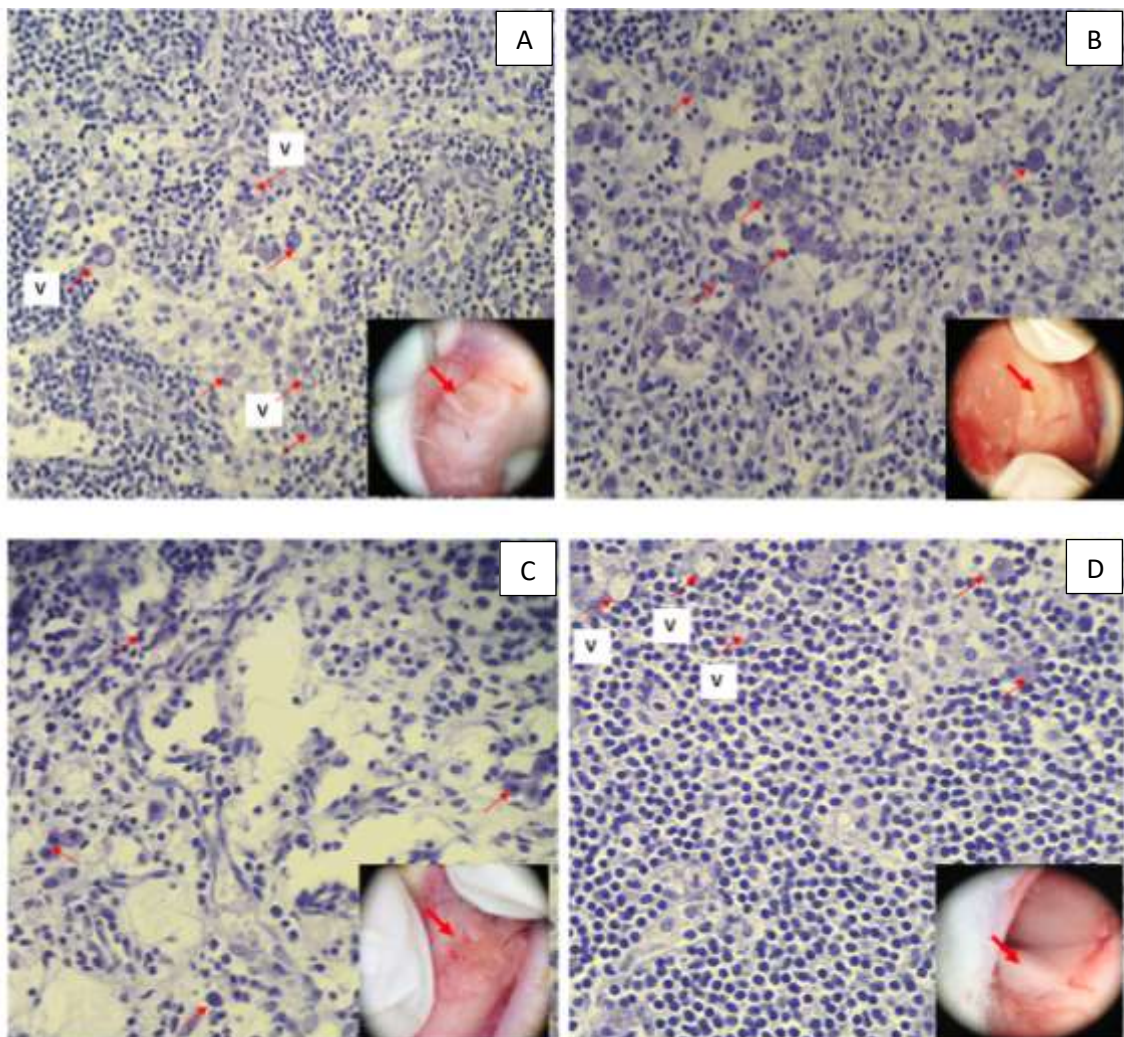
5.3.5 Ensaio de termoestabilidade do marcador biológico

Primeiro, as amostras (10 mg/mL de [Hb]) foram expostas a diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C, 37 °C e 100 °C) por 10 min e, posteriormente, aplicadas na pata posterior de cada animal. Após a aplicação de 0,5 mL de azul patente (controle positivo) e 1 mL do concentrado de hemoglobina em diferentes temperaturas, drenando por 2 h, observou-se que 25 °C seria a temperatura ideal para maior estabilidade do concentrado de Hb, apresentando uma marcação tecidual muito boa (Figura 35 B) e um aumento do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma (22,8 macrófagos por quadrante) (Figura 35 e Gráfico 3).

Macroscopicamente, os concentrados de Hb mantidos nas temperaturas 4 °C (Figura 35 A) e 37 °C (Figura 35 C) apresentam marcação tecidual regular, o que é confirmado quando analisado os histopatológicos, sendo observado 13,2 macrófagos por quadrante e presença de vacúolos no seu citoplasma, e 7,4 macrófagos por quadrante, respectivamente (Figura 35 e Gráfico 3).

Após a drenagem do concentrado de Hb a 100°C, observou-se que não houve marcação macroscópica (Figura 35 D), assim como uma brusca diminuição do número de macrófagos com presença de [Hb] em seu citosol (1,13 macrófagos por quadrante) e aumento de vacúolos no seu citoplasma (Figuras 35 e Gráfico 3).

Figura 35 - Ensaio *in vivo* com intuito de avaliar a termoestabilidade padrão para marcação tecidual do linfonodo da região poplíteia

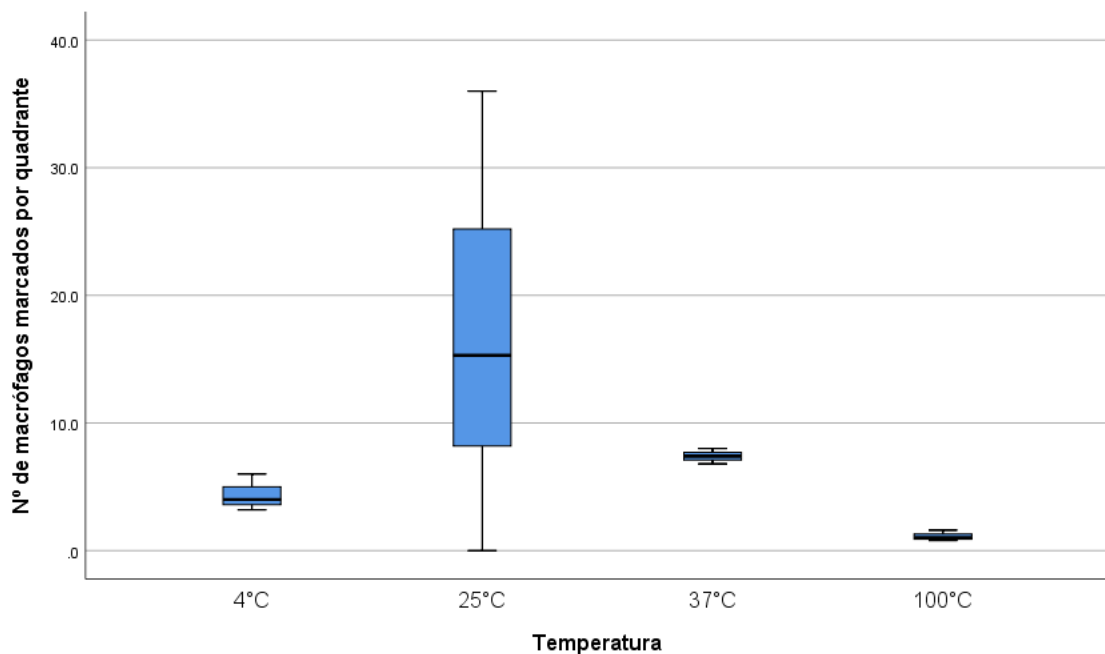


Fonte: Elaboração da autora.

Pode-se observar, na Figura 35, ensaios *in vivo* com intuito de avaliar a termoestabilidade padrão para marcação tecidual do linfonodo da região poplíteia. Injeção de 1 mL do concentrado de Hb e 0,5 mL de azul patente (controle positivo) em cada pata posterior, respectivamente. Visão macroscópica e histopatológica (40 x) do linfonodo poplíteo apresentam marcação tecidual mais efetiva, após aplicação de 10

mg/mL do [Hb] à 25 °C (B), drenado por 2h. Observa-se diminuição na marcação tecidual do tecido linfóide, nas temperaturas de 4 °C (A) e 37 °C (C), quando comparado com 25 °C, sendo reafirmado nos cortes histopatológicos com a presença de seios subcapsulares apresentando baixa concentração de macrófagos marcados com [Hb]. Na temperatura de 100 °C (D), não foi observada marcação macroscópica e, conseqüentemente, brusca diminuição do número de macrófagos com presença de [Hb] em seu citosol (1,13 macrófagos por quadrante). Presença de aumento de macrófagos vacuolados (V) nas temperaturas de 4 °C e 100 °C.

Gráfico 3 - Relevância estatística do número de macrófagos



Fonte: Elaboração da autora.

No Gráfico 3, tem-se a relevância estatística do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma, drenados por 2h, mantidos em diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C, 37 °C e 100 °C), em que a temperatura de 25 °C possui maior número de macrófagos marcados por quadrante.

5.3.6 Ensaio para obtenção de metahemoglobina em diferentes concentrações e a sua relação com a marcação tecidual do linfonodo sentinela

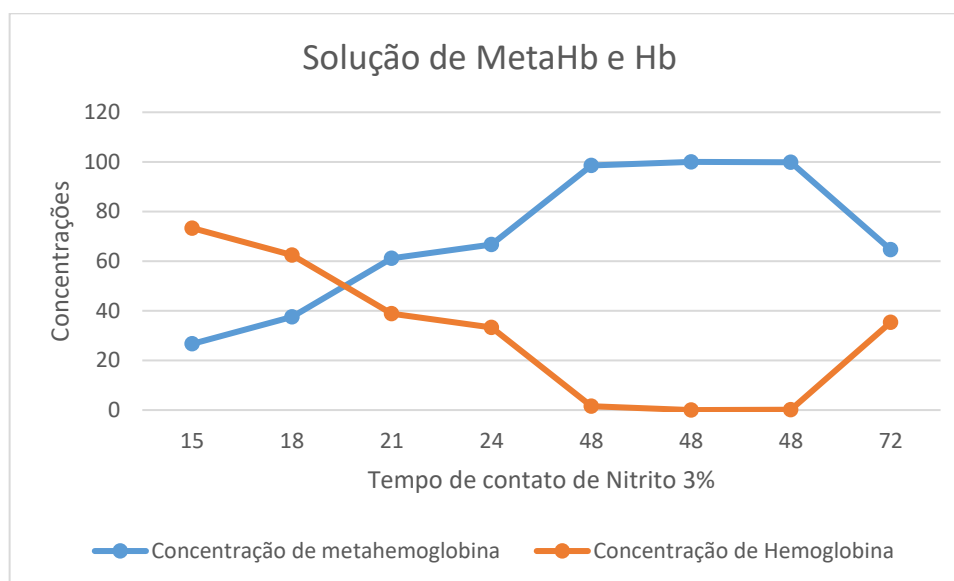
Visando avaliar o efeito da concentração de metaHb na marcação tecidual do linfonodo sentinela da região poplítea, foram aplicadas soluções contendo metaHb em diferentes concentrações. Para se tornar possível o preparo das amostras contendo metaHb, realizou-se a aplicação do nitrito a 3% ao concentrado de hemoglobina deixando-os em contato por diferentes tempos (15 h, 18 h, 21 h, 24 h, 48 h-triplicata e 72 h). Após a obtenção das soluções nos tempos de contato preconizados, foram realizados os cálculos para revelar as concentrações de metahemoglobina, sendo obtidas diferentes medidas de Hb e metaHb (Tabela 1). O aumento da concentração da metaHb acontece de forma contínua e inversamente proporcional ao aumento da concentração de Hb, chegando ao pico com 48h de tempo de contato entre a solução de concentrado de Hb + nitrito a 3%, e ocorrendo decréscimo na concentração de metaHb com 72 h de contato (Gráfico 4).

Tabela 1 - Concentração de metahemoglobina e hemoglobina, por tempo de contato do Nitrito com o concentrado de hemoglobina

Amostras (Tempo de contato de Nitrito 3% com concentrado de Hb)	Metahemoglobina (%)	Metahemoglobina (mg/mL)	Hemoglobina (%)	Hemoglobina (mg/mL)
15 h (rata 1)	26,66	2,67	73,34	7,33
18 h (rata 2)	37,5	3,75	62,5	6,25
21 h (rata 3)	61,11	6,11	38,89	3,89
24 h (rata 4)	66,66	6,67	33,34	3,33
48 h (rata 5)	98,5	9,85	1,5	0,15
48 h (rata 6)	100	10	0	0
48 h (rata 7)	99,8	9,98	0,2	0,02
72 h (rata 8)	64,70	6,47	35,30	3,53

Fonte: Elaboração da autora.

Gráfico 4 - Gráfico demonstrativo da relação entre concentração de hemoglobina e metahemoglobina, após o contato do concentrado de Hb com Nitrito a 3%



Fonte: Elaboração da autora.

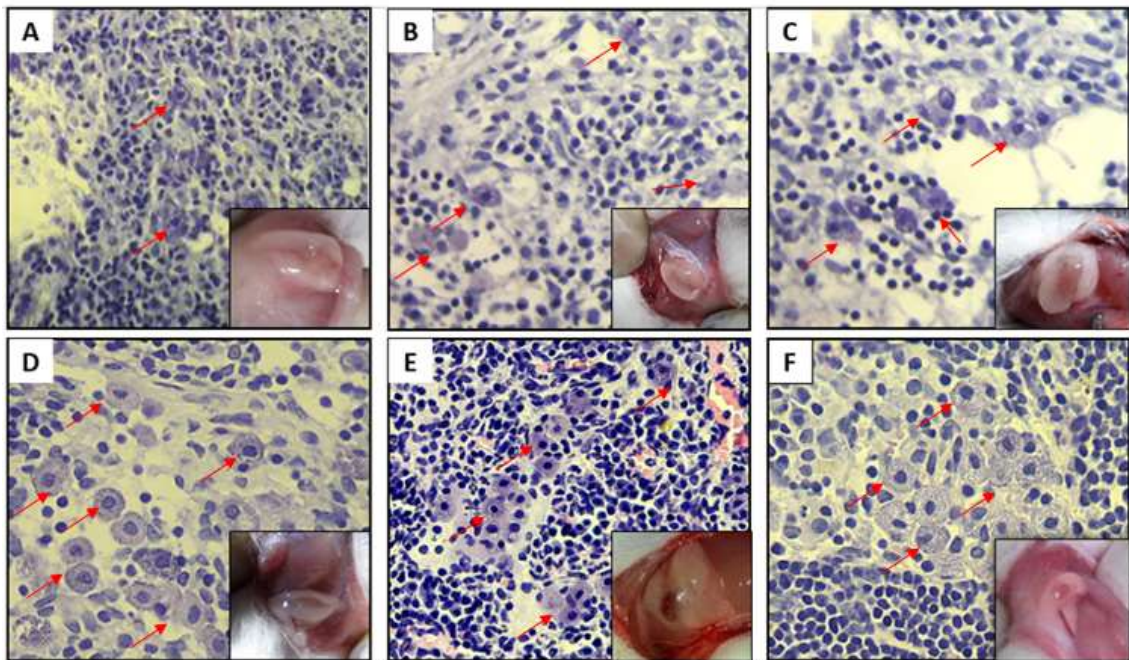
Depois da obtenção das amostras em diferentes concentrações de metaHb, realizou-se os ensaios em animais, com intuito de avaliar a relação da metaHb com a marcação tecidual do linfonodo e o aumento do número de macrófagos com vestígios de corantes no seu citoplasma.

Após as aplicações das amostras, citadas na tabela acima (Tabela 1), em animais, foi possível observar que o aumento da concentração de metaHb é diretamente proporcional ao aumento da coloração do linfonodo sentinela: 2,67 mg/mL de metaHb (marcação tecidual regular; 7,2 macrófagos/campo) (Figura 36 A), 3,75 mg/mL de metaHb (marcação tecidual regular; 9,4 macrófagos/campo) (Figura 36 B), 6,11 mg/mL de metaHb (marcação tecidual boa; 18 macrófagos/campo) (Figura 36 C), 6,67 mg/mL (marcação tecidual muito boa; 26,8 macrófagos/campo) (Figura 36 D) ~10 mg/mL (marcação tecidual ótima; 32,87 macrófagos/campo) (Figura 36 E) e 6,47 mg/mL (marcação tecidual muito boa; 21,8 macrófagos/campo) (Figura 36 F), sendo reafirmado nos cortes histopatológicos com a presença de seios subcapsulares apresentando alta concentração de macrófagos marcados com metaHb. Sendo assim, o crescente tempo de contato do nitrito a 3% com a amostra até 48h, aumentava a concentração de metaHb de forma progressiva apresentando uma crescente coloração tecidual e um aumento gradativo do número de macrófagos com vestígios da solução no seu citoplasma (Figura 36 A-E e Gráfico 5). Após as 48 h, foi observado

um decréscimo da concentração de metaHb e uma diminuição da marcação macroscópica e microscópica do tecido linfoide (Figura 36 F e Gráfico 5).

As soluções que tinham maior concentração de Hb e menor concentração de metahemoglobina apresentavam coloração tecidual menos efetiva e um menor número de macrófagos com vestígios da solução no seu citoplasma, quando comparadas com linfonodos corados com soluções com alta concentração de metaHb (Figura 36 e Gráfico 5).

Figura 36 - ensaios *in vivo* com intuito de avaliar a concentração de metahemoglobina ideal para uma coloração efetiva do linfonodo sentinela da região poplítea

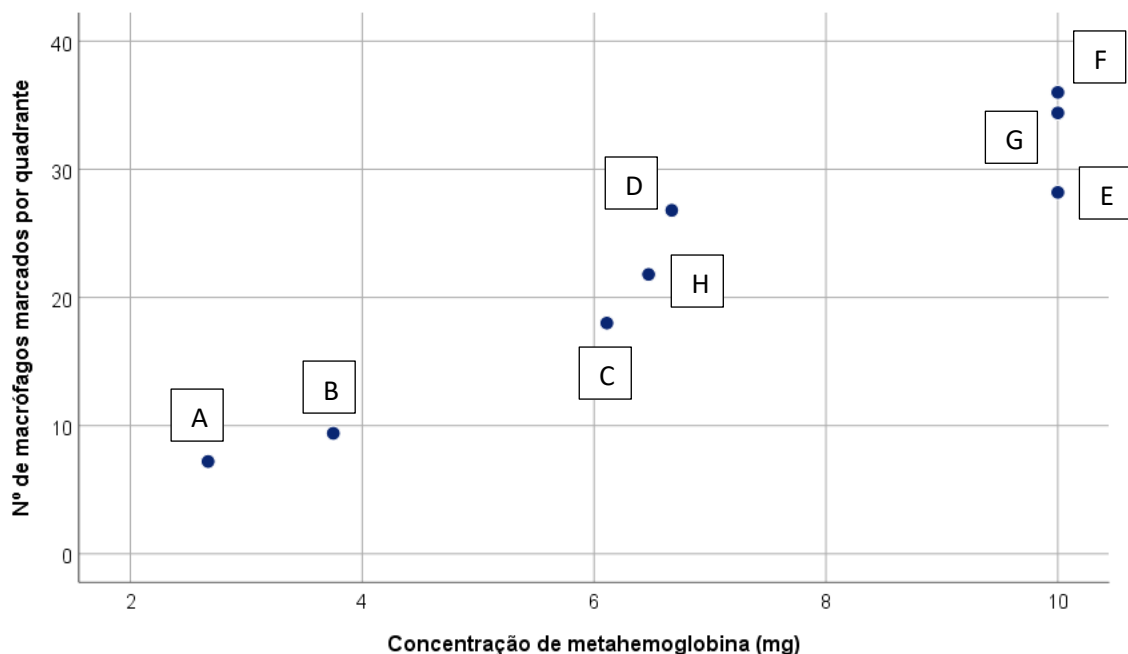


Fonte: Elaboração da autora.

Tem-se, na Figura 36, ensaios *in vivo* com intuito de avaliar a concentração de metahemoglobina ideal para uma coloração efetiva do linfonodo sentinela da região poplítea. Injeção de 1 mL da solução com diferentes concentrações de metaHb e 0,5 mL de azul patente (controle positivo) em cada pata posterior, respectivamente. Visão macroscópica e histopatológica (40 x) do linfonodo poplíteo apresentam marcação tecidual mais efetiva, na concentração de aproximadamente 10 mg/mL de metaHb, drenado por 2h. Concentrações de metaHb: A (2,67 mg/mL), B (3,75 mg/mL), C (6,11 mg/mL), D (6,67 mg/mL), E (\cong 10 mg/mL) e F (6,47 mg/mL). Observa-se aumento na

marcação tecidual do tecido linfóide proporcional ao aumento da concentração de metaHb: A regular (7,2 macrófagos/campo), B regular (9,4 macrófagos/campo), C boa (18 macrófagos/campo), D muito boa (26,8 macrófagos/campo), E ótima (32,87 macrófagos/campo) e F muito boa (21,8 macrófagos/campo), sendo reafirmado nos cortes histopatológicos com a presença de seios subcapsulares apresentando alta concentração de macrófagos marcados com metaHb. Após as 48h de tempo de contato entre [Hb] + Nitrito 3%, há uma redução significativa de metaHb, ocasionando redução na marcação do linfonodo poplíteo (muito boa) e do número de macrófagos com marcação no citoplasma (21,8 macrófago/campo).

Gráfico 5 - Relevância estatística do número de macrófagos



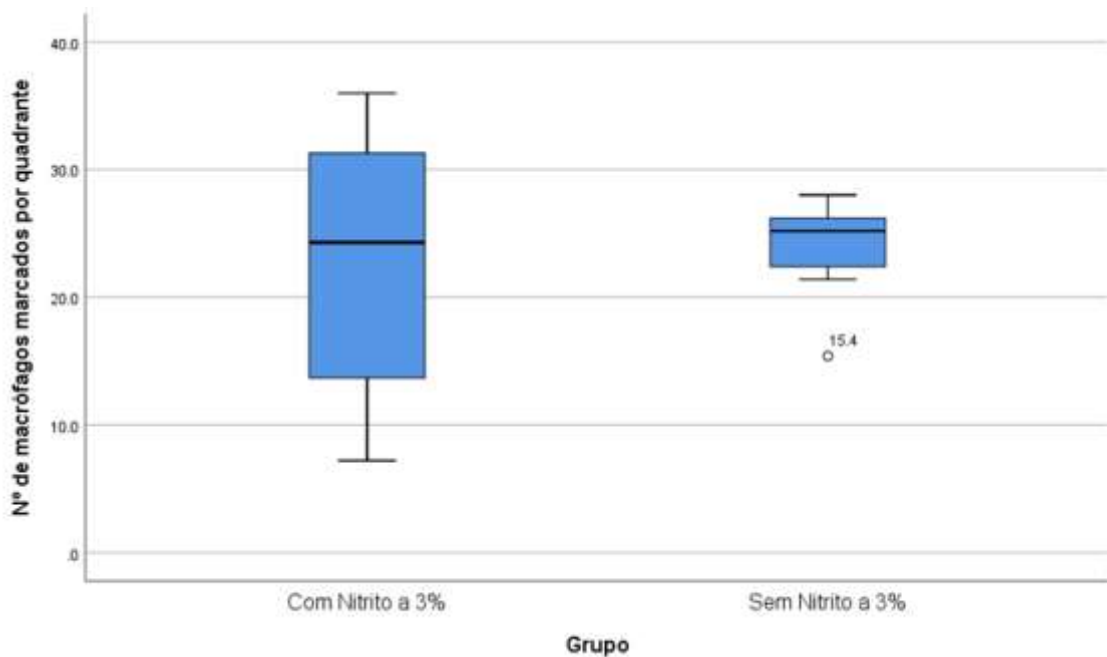
Fonte: Elaboração da autora.

No Gráfico 5, observa-se a relevância estatística do número de macrófagos com vestígios do concentrado de metaHb no seu citoplasma, drenados por 2 h, em diferentes concentrações (A - 2,67 mg/mL; B - 3,75 mg/mL; C - 6,11 mg/mL; D - 6,67 mg/mL; E - 9,85 mg/mL; F - 10 mg/mL; G - 9,98 mg/mL e H - 6,47 mg/mL), em que a concentração de $\cong 10$ mg/mL possui maior marcação tecidual macroscópica e maior número de macrófagos marcados.

O nitrito a 3% possui papel relevante na marcação do LS, pois, até chegar ao limiar da reação, quanto maior for o seu tempo de contato com o concentrado de

Hb, maior será a concentração de metaHb. Comparando todos os ensaios realizados com concentrado de Hb, com e sem nitrito a 3%, observa-se que as amostras com nitrito apresentam aumento do número de macrófagos com marcação no citoplasma (Gráfico 6), o que contribui de forma significativa para uma marcação tecidual otimizada (Figura 35).

Gráfico 6 - Relevância estatística do maior número de macrófagos com vestígios do concentrado de hemoglobina com nitrito



Fonte: Elaboração da autora.

Pode-se ver, no Gráfico 6, a relevância estatística do maior número de macrófagos com vestígios do concentrado de hemoglobina com nitrito (maior [MetaHb]) no seu citoplasma, quando comparado com a presença de vestígios do concentrado de hemoglobina (menor [MetaHb]) sem nitrito no citoplasma dos macrófagos.

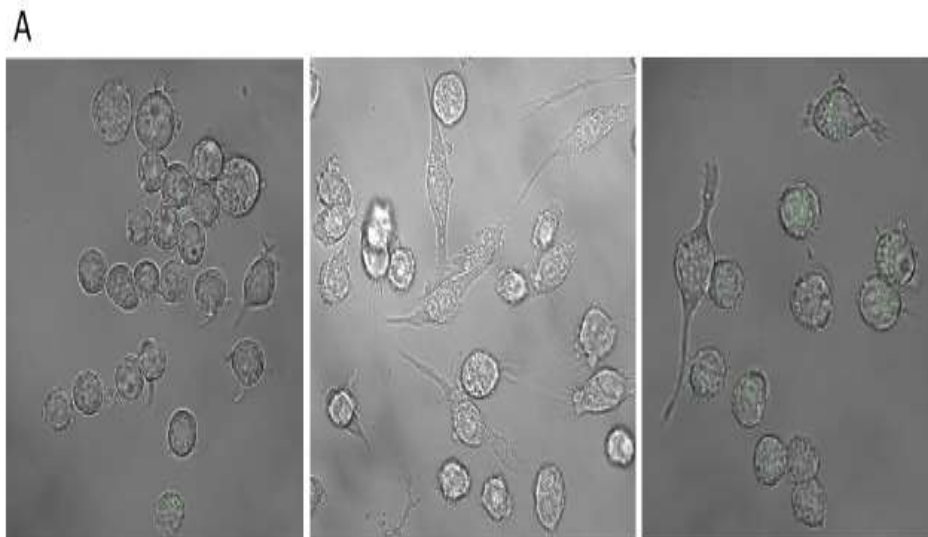
5.4 Microscopia confocal

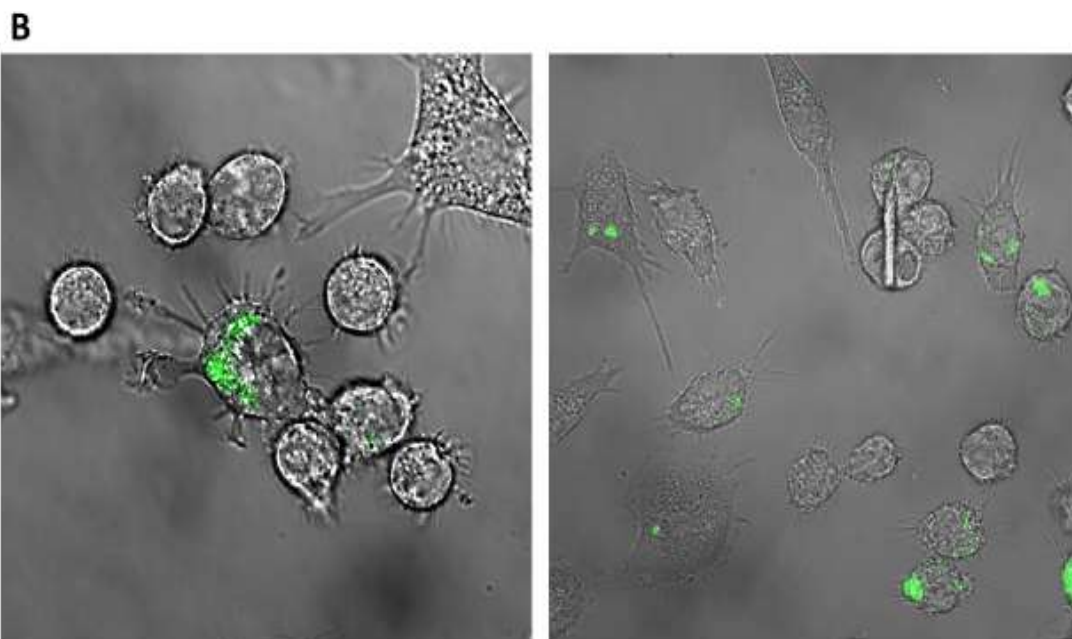
Uma vez identificada a proteína responsável pela marcação tecidual do linfonodo sentinela, foram realizados experimentos com auxílio da microscopia confocal para avaliar a presença de vestígios de hemoglobina no citoplasma e/ou

matriz extracelular dos macrófagos *in vivo*. As células fagocíticas foram estimuladas com 10 mg/mL do [Hb] e mantidas por 24 h, a temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Por fim, os macrófagos foram avaliados utilizando 540 nm de intensidade de fluorescência.

Foi possível observar que as células estimuladas pelo concentrado de Hb exibiam expressão significativa, quando comparadas com o controle negativo (macrófagos em meio de cultura) (Figura 37 A), onde as células expostas ao [Hb] encontravam-se bastante reativas (pseudópodes) e apresentavam vesículas que emitiam fluorescência verde (Figura 37 B).

Figura 37 - Imagens com microscopia confocal da presença de fagossomos contendo concentrado de Hb





Fonte: Elaboração da autora.

Na Figura 37, têm-se imagens com microscopia confocal da presença de fagossomos contendo concentrado de Hb, após estímulo fagocítico dos macrófagos. As figuras A, são imagens do controle negativo, onde os macrófagos estão expostos somente ao meio de cultura. Enquanto que as figuras B são macrófagos em contato com o concentrado de hemoglobina por 24 h, onde observa-se a formação de vesículas que emitem fluorescência verde, quando lidas a 540 nm.

6 DISCUSSÃO

Em 2009, uma nova linha de pesquisa experimental em animais apresentou a hemossiderina, produto da degradação da hemoglobina, como um possível marcador do linfonodo sentinela em mama de cadelas. Nesse estudo, a associação de hemossiderina e Tc 99m revelou resultados semelhantes na BLS quando comparados ao tecnécio (Tc 99m) e azul patente. A hemossiderina apresentou-se, experimentalmente, como um novo corante, isento de efeitos adversos e de baixo custo, tornando-se uma alternativa aos corantes atuais (PINHEIRO *et al.*, 2009). Posteriormente ao estudo de Pinheiro, Vasques *et al.* (2015) iniciaram estudos sobre a utilização da hemossiderina em pacientes com câncer de mama com tumores iniciais (T1/T2) e axila clinicamente negativa. Anos depois, Aguiar *et al.* (2017) avaliaram a eficácia da hemossiderina como marcador do LS em cânceres de mama em pacientes portadoras de tumores localmente avançados (T2 > 4 cm/T3/T4). Ambos obtiveram sucesso quando comparados com teste padrão ouro (Tc 99).

Apesar de ser comprovada a eficiência do novo marcador autólogo do sangue no método de identificação do linfonodo sentinela, existem controvérsias sobre a afirmação de que este marcador seria a “hemossiderina”, como afirmaram os autores Pinheiro *et al.* (2009), Vasques *et al.* (2015) e Aguiar *et al.* (2017), pois a hemossiderina é oriunda da degradação química dos núcleos de ferritina através de proteólise lisossomal (BELL *et al.*, 1984; WEIR, GIBSON e PETERS, 1984), requerendo uma maior complexidade no seu preparo (WEIR, GIBSON e PETERS, 1984; SAITO, 2014). O método para obtenção da ‘hemossiderina’ destas pesquisas possuíam baixa complexidade:

(...) era centrifugado a 2000 rpm, a 22°C, por dez minutos. O material centrifugado se distribuiu em três camadas no tubo de ensaio. As camadas superior e intermediária (soro) eram descartadas e a camada inferior (hemácias) diluída com soro fisiológico em igual volume ao retirado, e homogeneizado manualmente em câmara protegida por fluxo laminar. A solução obtida era novamente centrifugada (3800 rpm por três minutos), com o aparecimento de duas fases. A primeira era descartada e o volume retirado repostado com água bidestilada, na câmara de

fluxo laminar, provocando a hemólise do concentrado de hemácias. Após a terceira e última centrifugação (3800rpm por três minutos), obteve-se uma única fase de hemácias lisadas, um produto rico em hemossiderina em suspensão no líquido avermelhado. (Vasques *et al.*, 2015; Aguiar *et al.*, 2017).

Sabe-se que o processo de isolamento da hemossiderina é experimentado há décadas e envolve diversas etapas que vão desde a obtenção de um extrato bruto até a purificação final (MCKAY e FINEBERG, 1964; LUDEWIG e FRANZ, 1970; WEIR, GIBSON e PETERS, 1984), não sendo possível ocorrer o isolamento propriamente dito da hemossiderina de forma tão elementar como o método descrito pelos autores citados anteriormente. Considerando os benefícios do novo marcador autólogo do sangue, fomos impelidos ao desenvolvimento de um marcador biológico otimizado, tendo como objetivos a maximização da marcação dos linfonodos, assim como o isolamento e doseamento da substância responsável pela coloração através da padronização da extração do concentrado de hemácias hemolisadas e da purificação da proteína responsável por esta marcação tecidual.

6.1 Padronização da obtenção do extrato total (concentrado de hemácias hemolisadas)

Tendo em vista que o marcador autólogo do sangue utilizado anteriormente seria constituído por um *pool* de proteínas derivadas do sangue total, buscou-se a diminuição de prováveis contaminantes desde a preparação do extrato total até o isolamento da substância responsável pela marcação do linfonodo sentinela da região poplítea de ratas wistar. Para isso, inicialmente, foram realizados ensaios para obtenção do extrato total, visando extrair somente as proteínas eritrocitárias.

A obtenção do extrato total da nossa pesquisa apresentou dados qualitativos bastante satisfatórios, através dos quais observou-se nas micrografias uma expressiva diminuição do número de leucócitos residuais (Figura 25) e de hemácias integras após hemólise (Figura 26). Os indicadores quantitativos após a obtenção dos concentrados de hemácias lavadas e hemolisadas estão dentro dos critérios de aceitação para controle da qualidade de concentrado de hemácias desleucocitados preconizados pela Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e

Hemoderivados (Quadro 4) (SAKUMA, OTTOBONI e SIERRA, 2011), apresentando a contagem do número de leucócitos residuais menores que $5,0 \times 10^6/\text{unid.}$ O grau de hemólise maior que 80% sugere que houve eficiência na hemólise por meio hipotônico (água ultrapura), capaz de provocar drástica hemólise no concentrado de hemácias estudado, pois não se observa a presença de células intactas, somente resíduos de membrana celular na microscopia óptica (Figura 26). O elevado rendimento de proteínas eritrocitárias do ET, sendo obtido em média 1,76 mg/mL, a elevada concentração de hemoglobina total, a redução do número de contaminantes celulares derivados do sangue total e o elevado grau de hemólise demonstram que a metodologia empregada na sua obtenção é bastante eficiente.

A eletroforese em gel 2D de poliacrilamida- dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) do ET evidenciou a presença das principais proteínas eritrocitárias: alta concentração de hemoglobina- cadeias alfa e beta (15 e 16 kDa/pl 8,69 e 7,28, respectivamente) e suas isoformas com ampla variação de pl, metahemoglobina redutase (30 kDa/pl 6.8) e anidrase carbônica (29 kDa/pl 6.8) (Figura 27). O dado obtido por essa eletroforese reforça a hipótese de que não só a hemossiderina, mas também o marcador autólogo do sangue é responsável pela coloração do LS.

6.2 Purificação da hemoglobina

A principal proteína solúvel encontrada nos eritrócitos é a hemoglobina, sendo representada por aproximadamente 95% do peso seco de um eritrócito e cerca de 75% da proteína total do sangue (RODWELL, 2015; AZEVEDO, 2014; VOET, 2013). De fato, o resultado da eletroforese 2D mostra alta concentração de hemoglobina e suas isoformas com ampla variação de pl (Figura 27). A hemoglobina é uma proteína tetramérica composta por 2 cadeias α (cada uma com 141 resíduos) e 2 cadeias β (cada uma com 146 resíduos) de globina, em que as quatro unidades polipeptídicas estão ligadas entre si por ligações não covalentes. Em cada cadeia da estrutura da proteína contém um grupo prostético heme (responsável pela cor do sangue), composto por um anel protoporfirínico contendo um átomo de ferro no seu estado ferroso (Fe^{2+}). O átomo de ferro de cada grupo prostético heme está ligado a uma cadeia lateral de histidina (cadeia β está ligada a His63 e a cadeia α His58), que coloca o grupo heme na ligação central, na posição E7 (AZEVEDO, 2014; GORDON-SMITH, 2007, 2013; KLINKEN, 2002; NELSON e COX, 2014). Cerca de 1 a 2% da Hb

encontrada no sangue humano são metahemoglobinas. Essa forma é produto da oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} , de forma que o heme é oxidado a hematina. A metaHb pode ser obtida de diversas formas, por exemplo, devido à auto-oxidação da oxiHb, consequência da sua baixa estabilidade em solução (NELSON e COX, 2014; VOET, 2013).

Após as observações anteriores, voltamos a atenção para a importância da purificação da hemoglobina e suas particularidades, além da execução das experimentações *in vivo*. Comparando diferentes métodos de purificação da hemoglobina, Elmer *et al* (2010) afirmaram que os processos de purificação de Hb possuem o mesmo fluxo de realização: (1) fracionamento dos eritrócitos, (2) lise de eritrócitos e (3) um esquema de purificação final. Na primeira fase, o sangue total é centrifugado para produzir uma camada concentrada de eritrócitos embaixo de uma fina camada de leucócitos e um sobrenadante de soro. Depois de lavar os glóbulos vermelhos com uma solução salina isotônica para remover quaisquer proteínas séricas e anticorpos, as hemácias fracionadas são lisadas em uma solução tampão hipotônica para liberação encapsulada Hb e outras proteínas eritrocitárias e, por fim, o lisado é purificado utilizando técnicas cromatográficas para remover impurezas de proteínas eritrocitárias e produzir Hb pura (ELMER *et al.*, 2010).

Buscando o máximo de separação das macromoléculas presentes na solução eritrocitária e conseqüentemente a remoção de contaminantes e isolamento da Hb, inicialmente, foi realizada como ensaio, a cromatografia de exclusão molecular em bancada, utilizando um gel com ampla resolução das massas moleculares: Sephadex G100 (Resolução: 4-150 KDa). O concentrado de hemoglobina foi recuperado a partir da eluição da coluna de exclusão com uma solução tampão, contendo solução de Citrato trissódico 22 g/L e ácido cítrico 8 g/L a 0,1 M e pH 7,0, e posterior ultracentrifugação. De acordo com a sequência de aminoácidos, a hemoglobina apresenta um peso molecular estimado de 67.000 Da (LATHE e RUTHEVEN, 1956), correspondendo 15 KDa (monômeros), 32 KDa (dímeros), 50 KDa (trímeros) e 64 KDa (tetrâmeros) (ELMER *et al.*, 2010), valores próximos daquele estimado neste trabalho: ~15 KDa e 32 KDa. Tal resultado é significativo levando em consideração que o erro do referido método eletroforético é de aproximadamente 10%, desde que não estejam envolvidas proteínas com pI em pH muito extremos ou ainda apresentando pesos moleculares muito baixos (SILVA JR., 2001). Mesmo com a afirmação de Elmer (2010) de que a cromatografia teria isolado somente

hemoglobina, sabe-se que outras proteínas, como anidrase carbônica (MW ~ 29 KDa) (ANDERSSON, NYMAN e STRID, 1972; SAHIN et al., 2014), superóxido dismutase (MW ~ 30 KDa) (SUN e PALMER, 2008) mesmo em concentrações inferiores a 10% da solução, podem estar presentes (LU et al, 2004; DIMINO e PALMER, 2007).

Visto o baixo rendimento do concentrado de Hb (0,14 mg/mL), as dificuldades de manipulação do gel Sephadex G 100 em bancada e a necessidade de realizar a ultrafiltração (centricon), este método de purificação consumiu considerável tempo de trabalho durante o semestre, dificultando a realização dos nossos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Devido a necessidade de uma nova estratégia de purificação da Hb e a considerável heterogeneidade de preparação desta macromolécula isolada por vários modelos cromatográficos existentes na literatura: extração em fase aquosa (LEE e KAN, 1993), aquecimento na presença de agentes redutores (o que faz com que as impurezas precipitem) (LI et al., 2006), e vários outros tipos de cromatografias (HSIA et al., 1986; LIAU et al., 2003; WETZ e GAWRYL, 1996), buscou-se um novo método cromatográfico a ser empregado.

Haja vista as características bioquímicas da Hb, o método cromatográfico deveria respeitar as suas peculiaridades, propiciando alto rendimento e baixo consumo de tempo. Analisando essas particularidades, o recurso de purificação adotado foi a cromatografia de troca iônica em AKTA Purifer, onde o Fe-III presente no grupo prostético heme da Hb diluído em solução ácida (Tris-HCl 20 mM pH 7,2) possui alta afinidade por resina de troca catiônica (Carboximetil-celulose) (KANAORI et al., 2011; ABRÃO, 1972), dando margem a uma melhor separação da hemoglobina de outras proteínas contidas na referida preparação. A purificação realizada pela CM produziu maior rendimento na produção do concentrado de Hb (0,5278 mg/mL) e em menor tempo hábil, quando comparado ao método empregado na cromatografia de exclusão Sephadex G-100.

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS confirmou a homogeneidade das amostras nos dois métodos de purificação empregados. Na cromatografia utilizando Sephadex G-100, a primeira etapa de purificação apresentou α e β formando monômeros (15 KDa e 16 KDa, respectivamente) e dímeros (\cong 32 KDa) da Hb e um resíduo de proteína globínica (45 KDa); na segunda etapa de purificação, retirou-se o contaminante (resíduo de proteína globínica) através da ultrafiltração (centricon) (Figura 28 B). A cromatografia de troca catiônica empregando Carboximetil-celulose apresentou redução de contaminantes, exibindo somente α e β

formando monômeros (15 KDa e 16 KDa, respectivamente) e dímeros (\cong 32 KDa) da Hb (Figura 30 A).

6.3 Aplicações de marcador biológico *in vivo*

Visando a realização da biópsia do linfonodo sentinela em ensaios com ratas wistar, fez-se necessária a padronização do método *in vivo* para futuras triagens do novo marcador biológico (concentrado de Hb) otimizado. Para isso, seguiu-se um protocolo animal de BLS adaptado, preconizado por Woyntforth, Flecknell (1992) e Oliveira *et al* (2003), onde foram injetados na camada subdérmica das patas posteriores das ratas: azul patente (controle positivo) e concentrado de Hb. Inicialmente, padronizou-se que 2 h seria o tempo ideal de drenagem entre o sítio de injeção e a fossa poplítea, apresentando uma marcação tecidual mais evidente (Figura 31) e um aumento do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma, quando comparado com os outros tempos de drenagem (1 h, 4 h e 6 h) (Figura 31 e Gráfico 01). Por fim, objetivando avaliar o limiar de saturação do tecido linfóide para uma marcação mais eficiente em ensaio animal, determinou-se que a concentração padrão seria a injeção de 10 mg/mL do concentrado de Hb, sendo observadas uma melhor marcação macroscópica e a presença de um maior número de macrófagos com vestígios de [Hb] no seu citoplasma, quando comparado com as outras concentrações (5 mg/mL e 15 mg/mL) (Figura 32 e Gráfico 02).

6.4 Atividade da fração isolada após proteólise

Tendo em vista que o meio extracelular contém proteases (enzimas que catalisam clivagem hidrolítica das ligações peptídicas) e outras enzimas degradativas, e que após a hemólise eritrocitária as proteínas liberadas podem ser inativadas (NELSON e COX, 2014), buscou-se avaliar o quanto as enzimas proteolíticas poderiam interferir de forma direta na marcação tecidual do LS ao utilizar o concentrado de Hb sobre o efeito das proteases. Para isso, inicialmente, avaliou-se a utilização de uma enzima otimizada para ser empregada na degradação total do concentrado de Hb através de clivagem das suas ligações peptídicas, realizando ensaios utilizando o concentrado de Hb como substrato e a adição das enzimas (tripsina, pepsina e papaína) em temperaturas diferentes (4 °C, 25 °C e 37 °C) para

cada tempo de incubação (30 min, 1 h e 4 h), avaliando, assim, qual temperatura e tempo de incubação seriam ideais para a realização das reações enzimáticas. Posteriormente, foi observado que a tripsina incubada a 37 °C por 4 h produz um maior número de produtos de degradação da Hb (Figura 33). Essa enzima foi então selecionada para a realização do ensaio em animal, buscando, assim, avaliar a necessidade da integridade proteica da Hb na marcação tecidual do linfonodo sentinela.

Após a realização do ensaio em animal com a solução contendo o concentrado de Hb e tripsina, observou-se a ausência de marcação tecidual (Figura 34) e, no histopatológico, a presença de número reduzido de macrófagos com vestígios da amostra e de vacúolos no seu citoplasma. Analisando os resultados realizados *in vivo*, concluímos que para uma marcação tecidual efetiva é importante a manutenção da integridade proteica da amostra a ser injetada, sendo indicado a utilização de inibidores de proteases no concentrado de Hb, assim, pode-se garantir uma potencialização na marcação tecidual do LS. Sabe-se que a coadministração de agentes inibidores das enzimas proteolíticas é uma estratégia possível para o aumento da biodisponibilidade oral de peptídios e proteínas, como foi demonstrado em vários estudos *in vivo* (LANGGUTH *et al.*, 1997; KIMURA *et al.*, 1996; MORISHITA *et al.*, 1992a), porém, a utilização de inibidores proteolíticos conjugados com o novo marcador biológico requer atenção e estudos futuros, pois a sua grande maioria possuem alta toxicidade (SILVA *et al.*, 2002).

6.5 Ensaio de termoestabilidade

A termoestabilidade é um fator preponderante na manutenção da atividade proteica, tendo em vista que a grande maioria das proteínas eritrocitárias é facilmente desnaturadas em temperaturas elevadas, como a hemossiderina. Existem, também, exceções como a ferritina, que possui resistência ao calor de até 75 °C (SAITO, 2014). Apesar da estabilidade térmica das proteínas variar muito, algumas delas desnaturam lentamente acima de 25 °C (VOET e VOET, 2013). Devido à grande variabilidade térmica das proteínas eritrocitárias, avaliou-se em qual temperatura o concentrado de Hb estaria mais estável e, para isso, injetou-se 10 mg/mL do concentrado de Hb que foram expostos por 10 min a diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C, 37 °C e 100 °C), drenando por 2 h, sendo observado que a 25 °C seria

alcançada a maior estabilidade da amostra, apresentando uma marcação tecidual muito boa (Figura 35 B) e um aumento do número de macrófagos com vestígios do concentrado de Hb no seu citoplasma (22,8 macrófagos por quadrante) (Figura 35 e Gráfico 3).

6.6 Ensaio para obtenção de metahemoglobina em diferentes concentrações e a sua relação com a marcação tecidual do linfonodo sentinela

Segundo Vasques, os resultados obtidos com linfocintilografia e ressonância magnética (RM) mostram uma maior intensidade de sinal em linfonodos que receberam injeção do marcador hemossiderina, quando comparados com regiões teciduais adjacentes a eles mesmos ou em relação aos linfonodos contralaterais (VASQUES, 2016). Sabe-se que, no caso de hematomas em evolução, o ferro sofre alterações na quelação e nos estados de spin dos elétrons, assim como na geometria molecular e na compartimentalização, que se manifestam por alterações características à imagem por RM (LUFKIN, 1999). No estágio agudo do hematoma, tipicamente aparece com iso ou hipossinal nas sequências ponderadas em T1 e com marcado hipossinal em T2 (alta concentração de desoxi-hemoglobina intracelular). No estágio subagudo, observa-se um hipersinal em T1 e T2 (efeitos paramagnéticos da meta-hemoglobina livre $[\text{Fe}^{3+}]$, produto da oxidação da hemoglobina $[\text{Fe}^{2+}]$). No estágio crônico, há halo de hipossinal em T1 e T2, que é atribuído à deposição de ferritina e hemossiderina (Tabela 2) (MARTINS *et al*, 2008; KAWASHINA, SANDLER e ERNEST, 1999).

Tabela 2 - Estágios do hematoma na ressonância magnética

Derivados eritrocitários	Estado oxidativo	T1	T2
Oxihemoglobina	Fe^{2+} , diamagnética	Iso ou hipossinal	Hipersinal
Desoxihemoglobina	Fe^{2+} , paramagnética	Iso ou hipossinal	Forte hipossinal ou ausência de sinal
MetaHb intracelular	Fe^{3+} , paramagnética	Hipersinal	Hipossinal
MetaHb extracelular	Fe^{3+} , paramagnética	Hipersinal	Hipersinal
Ferritina e Hemossiderina	Fe^{3+} , paramagnética	Iso e hipossinal	Hipossinal ou ausência de sinal

Fonte: Elaboração da autora.

Como é vastamente descrito pela literatura, a evolução do ferro no hematoma, inicialmente, encontra-se na forma de oxihemoglobina (Fe^{+2}), não apresentando elétrons pareados e é, portanto, diamagnético. Após desnaturação da oxihemoglobina, embora ainda contenha Fe^{+2} , origina-se a desoxihemoglobina com 4 elétrons não pareados. Devido à geometria molecular, os elétrons não pareados não podem chegar suficientemente próximo dos prótons de água para que ocorram interações próton-elétron, dipolo-dipolo, gerando pouco sinal magnético. Durante uma hipóxia continuada, há nas hemácias a oxidação irreversível da desoxihemoglobina a metahemoglobina. A metahemoglobina tem 5 elétrons não pareados e, devido a sua geometria, possibilita que os prótons da água se aproximem o suficiente para que ocorram interações próton-elétron, dipolo-dipolo, gerando um aumento no sinal magnético (Tabela 2) (LUFKIN, 1999).

Visto que as pacientes de Vasques *et al.* (2016) apresentaram hipersinal magnético no LS axilar após a injeção do marcador “hemossiderina” e que a metahemoglobina é o único derivado eritrocitário que emite hipersinal magnético, buscou-se avaliar o envolvimento da metahemoglobina na marcação tecidual do LS através de ensaios *in vivo* com diferentes concentrações de metaHb. Para se tornar possível o preparo das amostras contendo diferentes concentrações de metaHb, realizou-se a aplicação do nitrito a 3% ao concentrado de hemoglobina deixando-os em contato por diferentes tempos (15h, 18h, 21h, 24h, 48h-triplicata e 72h), chegando a diferentes concentrações (2,67 mg/mL, 3,75 mg/mL, 6,11 mg/mL, 6,67 mg/mL, \cong 10 mg/mL e 6,47 mg/mL, respectivamente), em que observou-se um crescente aumento na concentração de metaHb inversamente proporcional ao aumento da concentração de Hb, atingindo o pico com 48h de tempo de contato entre a solução de concentrado de Hb + nitrito a 3%, e ocorrendo decréscimo na concentração de metaHb com 72h de contato (Gráfico 3).

Os ensaios *in vivo* com amostras contendo 2,67 mg/mL, 3,75 mg/mL, 6,11 mg/mL, 6,67 mg/mL e \cong 10 mg/mL de metaHb, respectivamente, apresentaram uma crescente marcação tecidual e um aumento gradativo do número de macrófagos com vestígios da solução (alta [metaHb] e baixa [Hb]) no seu citoplasma (Figura 36 A-E e Gráfico 5). Após as 48h, foi observado um decréscimo da concentração de metaHb (6,47 mg/mL) e uma diminuição da marcação macroscópica e microscópica do tecido linfoide (Figura 36 F e Gráfico 5).

As soluções que tinham maior concentração de Hb e menor concentração de metahemoglobina apresentavam coloração tecidual menos efetiva e um menor número de macrófagos com vestígios da solução no seu citoplasma, quando comparadas com linfonodos corados com soluções com alta concentração de metaHb (Figura 36 e Gráfico 5).

Tendo em vista que as amostras do concentrado de Hb submetidas ao maior tempo de contato com nitrito (alta [metaHb] e baixa [Hb]) apresentaram melhores resultados de marcação tecidual e aumento no número de macrófagos com vestígios da solução (Figura 36 D-F), quando comparada às amostras de concentrado de Hb que possuem menor tempo de contato com nitrito (alta [Hb] e baixa [metaHb]) (Figura 36 A-C). Conclui-se que a metahemoglobina é a principal proteína eritrocitária responsável pela marcação otimizada do tecido linfoide, podendo ser absorvida de forma mais eficiente do que a hemoglobina e consequentemente obtendo a melhor marcação macroscópica e microscópica (Gráfico 5).

6.7 Microscopia confocal

Uma vez identificada a proteína responsável pela marcação tecidual do linfonodo sentinela, foram realizados experimentos com auxílio da microscopia confocal para reafirmar os resultados histopatológicos, avaliando a presença de vestígios de hemoglobina no citoplasma e/ou matriz extracelular dos macrófagos *in vivo*, utilizando um comprimento de onda de 540 nm. Após estímulo das células fagocíticas com 10 mg/mL de [Hb] por 24 h, a temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, observou-se que as células estimuladas pelo concentrado de Hb exibiam expressão significativa, quando comparadas com o controle negativo (macrófagos em meio de cultura) (Figura 37 A). Os macrófagos expostos ao [Hb] encontravam-se bastante reativos (aumento do número de pseudópodes) e apresentavam vesículas que emitiam fluorescência verde, que, supostamente, seriam fagossomas com conteúdo hemoglobínico (Figura 37 B).

Acredita-se que a internalização do concentrado de Hb pelas células fagocíticas, ocorra assim como a Hb liberada dos eritrócitos (em decorrência de doenças hemolíticas ou transfusão, por exemplo), estabelecendo um equilíbrio dinâmico na internalização e digestão da Hb. Os mecanismos de remoção da Hb são descritos por diversos autores, ocorrendo por meio do complexo haptoglobina-

hemoglobina (Hp-Hb) e do receptor CD-163 (ROBINSON, 1972; PIOMELLI e SEAMAN, 1993; CLARK, 1998; LEE *et al*, 1999; NIELSEN; MOLLER; MOESTRUP, 2010; SCHAER *et al.*, 2013; COSTA; FERTRIN; CONRAN, 2013; SANTOS, 2015).

A haptoglobina é uma glicoproteína de fase aguda encontrada na fração α_2 -globulina na maioria das espécies de mamíferos (HWANG; GREER, 1980). Essa proteína é formada por subunidades α e β , e apresenta três diferentes variações fenotípicas em humanos, a Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2. A haptoglobina apresenta alta afinidade pela hemoglobina e liga-se a seus dímeros na proporção 1:1 (um dímero de Hb para uma unidade $\alpha\beta$ da Hp) (ADAMS; WEISS, 1968; CHIANCONE *et al.*, 1968; NAGEL; GIBSON, 1971). A interação Hp-Hb é tida como uma das mais fortes interações não covalentes observadas no plasma (HWANG; GREER, 1980; NIELSEN; MOLLER; MOESTRUP, 2010) e esse complexo é considerado virtualmente irreversível (ANDERSEN *et al.*, 2012). Essa interação protege a Hb contra danos estruturais causados por peroxidação, como a formação de cross-link entre cadeias α e a oxidação de aminoácidos em regiões críticas presentes na cadeia β (como exemplo, Trp15, Cys93 e Cys112) (BUEHLER *et al.*, 2009; JIA *et al.*, 2007; NIELSEN; MOLLER; MOESTRUP, 2010).

O complexo Hp-Hb é rapidamente removido da circulação por macrófagos, através da interação de alta afinidade ao receptor CD163 (ANDERSEN *et al.*, 2012; JIA *et al.*, 2013; NIELSEN; MOLLER; MOESTRUP, 2010). Esse receptor apresenta também, em menor intensidade, afinidade pela Hb livre, sendo este um fator importante para a remoção da Hb plasmática em situações nas quais ocorre a depleção da haptoglobina, como observado após a administração de alguns HBOCs (SCHAER *et al.*, 2006). Após a internalização por macrófagos, a digestão proteolítica libera o grupo heme da estrutura da Hb, o qual é, posteriormente, degradado no citosol pela enzima heme oxigenase (HMOX) com a formação de biliverdina, monóxido de carbono e ferro (BELCHER *et al.*, 2010; KNUTSON; WESSLING-RESNICK, 2003; MAINES, 1997, 2005).

6.8 Importância de um novo marcador otimizado

Nas últimas décadas, houve avanços significativos na terapia de pacientes com câncer de mama. O advento de mamógrafos mais modernos e a expansão do acesso a esse exame, campanhas de conscientização, o surgimento da *core biopsy*,

que é uma técnica menos invasiva de se obter um fragmento do tumor para a análise anatomopatológica, todos esses fatores contribuíram para o diagnóstico de lesões em estágio mais precoce. O tratamento cirúrgico se modificou com o tempo, tornando-se menos agressivo sem perder sua eficácia terapêutica (SOUZA *et al.*, 2015). A biópsia do linfonodo sentinela surgiu para contribuir com essa corrente de inovações, substituindo o esvaziamento axilar no estadiamento do câncer de mama inicial com axila clinicamente negativa (LYMAN *et al.*, 2014), tornando possível a substituição de técnicas extremamente invasivas e contraditórias (mastectomia total e esvaziamento axilar) por métodos cirúrgicos conservadores e mais precisos.

Entretanto, para que se torne possível a técnica cirúrgica da BLS, tradicionalmente são utilizados como marcadores o corante azul patente e o radiofármaco tecnécio. A associação dos dois métodos mostrou-se mais acurada para identificação do LS (RUTGERS, 2005; STRAVER *et al.*, 2010), porém, esses métodos possuem desvantagens relevantes, em revisão à literatura, o azul patente possui um expressivo número de reações de hipersensibilidade (SIMMONS *et al.*, 2003; SALHAB *et al.*, 2005; GOLSHAN; NAKHLIS, 2006; VARGHESE *et al.*, 2007; THILL *et al.*, 2014; KALIMO, JANSEN e KORMANO, 1981; MERTES *et al.*, 2008; HAQUE *et al.*, 2010; WOHLR *et al.*, 2004; SALHAB, SARAQBI e MOKBEL, 2005; SCHERER *et al.*, 2006) e o radiofármaco possui um alto custo (MAYES; DOUEK; PANKHURST, 2012; MARIANI *et al.*, 2001; PAGANELLI *et al.*, 1998) , o que dificulta a adesão dos cirurgiões na utilização e o acesso da população a esses métodos.

A BLS é considerada padrão ouro como método de avaliação prognóstica e preditiva, sendo uma prática consolidada na abordagem axilar do câncer de mama. Visto o aumento na indicação desse método na condução terapêutica oncológica, houve a necessidade de aprofundamento no conhecimento dos efeitos adversos associados aos corantes e substâncias radioativas utilizados na identificação do LS. Em função dessas observações, tornou-se impreterível a descoberta de substâncias equivalentes e com menores efeitos adversos às usadas no método de BLS. Outros marcadores para LS têm sido pesquisados e a nanopartícula férrica supermagnética resultou em taxa de identificação 77%, achados inferiores quando comparados com a utilização de hemossiderina como marcador em pacientes submetidas à BLS (VASQUES *et al.*, 2015; AGUIAR *et al.*, 2017).

A necessidade de investir em métodos de diagnóstico mais eficientes, abrangentes e que realmente diminuam o número de mortes por câncer de mama e

as inovações no campo de saúde são de vital importância para o bem-estar e qualidade de vida da população. Cada vez mais a ciência avança e, com isso, proporciona-nos acessos aos mais modernos métodos de diagnósticos. Contudo, os acessos a essas técnicas não são igualitários, muitos precisam, mas não têm condições de pagar pelos melhores métodos. É necessário encurtar as distâncias entre quem faz e quem pode colocar o feito no mercado, mas o primeiro passo já foi dado. Fato confirmado pelo exemplo de possível inovação citado nesse estudo, apresentando um marcador biológico do LS derivado do sangue otimizado, sendo capaz de substituir corantes disponíveis como o azul patente, possuindo como principais vantagens: baixo custo e alta eficiência.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a identificação e a aplicabilidade clínica do hemoderivado proteico como marcador tecidual na identificação do linfonodo sentinela em casos de câncer de mama inicial e localmente avançado. Foi comprovado que o processo de marcação é otimizado através da padronização das condições homeostáticas do marcador biológico.

A metahemoglobina demonstrou maior eficiência na biópsia do linfonodo sentinela como marcador biológico derivado do sangue, quando comparada com a Hb isolada. No entanto, o método utilizado para obtenção da metaHb necessita de nitrito a 3%, o que poderia ocasionar reações de hipersensibilidade nas pacientes.

Os achados do estudo trazem novas perspectivas para a identificação do linfonodo sentinela em casos de câncer de mama inicial e localmente avançado por meio da aplicação clínica do hemoderivado, tais como: (1) menor efeito colateral ao paciente quando comparado com os corantes de rotina atuais (tecnécio-99m e azul patente) e (2) menor custo aos centros de saúde, levando a uma melhor acessibilidade dos pacientes na detecção do linfonodo sentinela. Assim, os resultados do presente estudo, se aplicados clinicamente, podem impactar positivamente a saúde dos pacientes acometidos por câncer de mama por meio da redução de danos atrelados à linfadenectomia.

Futuros estudos são necessários para otimizar a obtenção da metahemoglobina usando substâncias de melhor biocompatibilidade que o nitrito.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1972.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 1, p. 113-131, 2002.

ADAMS, E. C.; WEISS, M. R. Calorimetric studies of the haemoglobin-haptoglobin reaction. **Biochem. J.**, Londres, v. 115, p. 441-447, 1969.

AGUIAR, P. H. W.; AQUINO, R. G. F.; ALVES, M. M.; CORREIA, J. M. S.; OLIVEIRA, A. L. S.; VIANA JÚNIOR, A. B.; PINHEIRO, L. G. P. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 6, p. 612-618, 2017.

AGUILLAR, V. L. N. **Rastreamento mamográfico em mulheres com idade entre 40 e 49 anos**. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.sbmastologia.com.br/artigo/rastreamento-mamografico-em-mulheres-com-idade-entre-40-e-49-anos-85.htm>. Acesso em: 19 set. 2017.

AHLGREN, L. Omitting axillary surgery for low-risk breast cancer patients. **Acta Oncol.**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 291-294, 1999.

AHMED, M.; DOUEK, M. What is the future of magnetic nano particles in the axillary management of breast cancer? **Breast Cancer Res. Tr.**, Amsterdã, v. 143, n. 2, p. 213-218, 2014.

ALBERTINI, J. J. *et al.* Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. **Jama**, Chicago, v. 276, n. 22, p. 1818-1822, 1996.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014**. Atlanta, 2013. Disponível em: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-42725.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Invasive Breast Cancer (IDC / ILC)**. Atlanta, 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>. Acesso em: 19 set. 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Carcinoma Ductal In Situ (DCIS)**. Atlanta, 2016. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/dcis.html>. Acesso em: 19 set. 2017.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Breast. *In*: GREENE, F. L. (org.). **AJCC Cancer Staging Manual**. Nova Iorque: Springer, 2002.

ANDERSEN, C. B. F. *et al.* Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex. **Nature**, Londres, v. 489, n. 1, p. 456-459, 2012.

ANDERSSON, B.; NYMAN, P.O; STRID, L. Amino acid sequence of human erythrocyte carbonic anhydrase B. **Biochem. Biophys. Res. Co.**, Nova Iorque, v. 48, n. 3, p. 670-677, 1972.

ANDRADE, W. P. **Cancer de mama: TNM**. 8. ed. São Paulo: Instituto de Oncomastologia, 2018.

AZEVEDO, M. R. A. **Hematologia Básica: Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial**. 5. ed. São Paulo: Revinter, 2014.

BARROS, A. C. S. D.; BARBOSA, E. M.; GEBRIM, L. H. **Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama**. São Paulo, 2001. Disponível em: http://www.bibliomed.com.br/diretrizes/pdf/cancer_mama.pdf. Acesso em: 29 set. 2017.

BARROSO-SOUSA, R.; METZGER-FILHO, O. Differences between in-vasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: results and therapeutic implications. **Ther. Adv. Med. Oncol.**, Newcastle, v. 8, n. 1, p. 261-266, 2016.

BASS, S. S.; COX, C. E.; KU, N. N.; BERMAN, C.; REINTGEN, D. S. O papel da biópsia de linfonodo sentinela no câncer de mama. **JACS**, Chicago, v. 189, n. 2, p. 183-194, 1999.

BATISTON, A. P.; TAMAKI, E. M.; SANTOS, M. L. M.; CAZOLA, L. H. O. Método de detecção do câncer de mama e suas implicações. **Cogitare Enferm.**, Curitiba, v. 14, n. 1, p. 50-64, 2009.

BELCHER, J. D. *et al.* Heme degradation and vascular injury. **Antioxid. Redox Signal**, Nova Iorque, v. 12, n. 2, p. 233-248, 2010.

BELL, S. H. *et al.* Mossbauer spectroscopic studies of human haemosiderin and ferritin. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdã, v. 787, n. 1, p. 227-236, 1984.

BERGMANN, A. **Prevalência de linfedema subsequente a tratamento cirúrgico para câncer de mama no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2000. Disponível em: http://portalteses.icict.fiocruz.br/transf.php?script=thes_chap&id=00004703&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 20 set. 2017.

BLESSING, W. D. *et al.* A comparison of methylene blue and lymphazurin in breast cancer sentinel node mapping. **Am. J. Surg.**, Londres, v. 184, n. 4, p. 341-345, 2002.

BOFF, R. A; WISINTAINER, F. **Mastologia moderna: abordagem multidisciplinar**. Caxias do Sul: Mesa Redonda, 2006.

BORGHETTI, K. M.; BARBOSA, F. S.; CALEFFI, M. *et al.* Linfonodo Sentinela: Uma Alternativa para o Esvaziamento Axilar? **Rev. Bras. Mastologia**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 148-155, 2000.

BORGSTEIN, P. J. *et al.* Functional lymphatic anatomy for sentinel node biopsy in breast cancer: echoes from the past and the periareolar blue method. **Ann. Surg.**, Filadélfia, v. 232, n. 1, p. 81, 2000.

BOXER, M. M.; DELANEY, G. P.; CHUA, B.H. A review of the management of ductal carcinoma in situ following breast conserving surgery. **Breast J.**, Londres, v. 22, n. 6, p. 1019-1025, 2013.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, Londres, v. 72, n. 1, p. 248-254.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação Nacional De Controle De Tabagismo - Contapp. "**Falando Sobre Câncer E Seus Fatores De Risco**". Rio De Janeiro, 1996.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer. **Ações de enfermagem para o controle do câncer**: uma proposta de integração ensino-serviço. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle do Câncer de Mama: Documento de Consenso. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 77-90, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1.008, de 30 set. 2015**. Brasília, 2015. Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt1008_30_09_2015.html. Acesso em: 21 set. 2017.

BUEHLER, P. W. *et al.* Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. **Blood**, Washington, v. 113, n. 11, p. 2578-2586, 2009.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M. C. F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comun. Ciênc. Saúde**, Brasília, v. 22, sup. 1, p. 69-82, 2011.

CABANAS, R. M. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer**, Atlanta, v. 39, n. 2, p. 456-466, 1977.

CALDAS, F. A. A.; ISA, H. L.V. R.; TRIPPPIA, A. C.; BÍSCARO, A. C. F. P. J.; SOUZA, E. C. C.; TAJARA, L. M. Controle de qualidade e artefatos em mamografia. **Radiol. Bras.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 295-300, 2005.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Aspectos atuais do metabolismo do ferro. **Arq. Méd. Hosp. Fac. Ciênc. Méd. Santa Casa São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 10-6, 2001.

CARMICHAEL, A. R.; BERRESFORD, A.; SAMI, A. & BOPARAI, R. Imprint cytology of needle core-biopsy specimens of breast lesion: is it best of both worlds? **Breast J.**, Londres, v. 13, n. 3, p. 232-234, 2004.

CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, Atlanta, v. 63, n. 1, p. 181-187, 1989.

CHAGPAR, A. B.; MARTIN, R. C.; SCOGGINS, C. R.; CARLSON, D. J.; LAIDLEY, A. L.; EL-EID, S. E. *et al.* Factors predicting failure to identify a sentinel lymph node in breast cancer. **Surgery**, Londres, v. 138, n. 1, p. 56-63, 2005.

CHALA, L. F.; BARROS, N. Avaliação das mamas com métodos de imagem. **Radiol. Bras.**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 4-6, 2007.

CHAO, C. *et al.* Reliable lymphatic drainage to axillary sentinel lymph nodes regardless of tumor location within the breast. **Am. J. Surg.**, Londres, v. 182, n. 4, p. 307-311, 2001.

CHIANCONE, E. *et al.* Studies on the reaction of haptoglobin with haemoglobin and haemoglobin chains. I. stoichiometry and affinity. **J. Mol. Biol.**, Londres, v. 34, p. 347-356, 1968.

CLARK, M. R. Senescence of red blood cells: progress and problem. **Physiol Rev.**, Rockville, v. 68, n. 1, p. 503-554, 1998.

COSTA, F. F.; FERTRIN, K. Y.; CONRAN, N. Síndrome hemolítica. Fisiopatologia e Clínica. Classificação. *In*: ZAGO, M. A., FALCÃO, R. P., PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 161-168.

CSERNI, G. *et al.* Comparison of vital dye-guided lymphatic mapping and dye plus gamma probe-guided sentinel node biopsy in breast cancer. **World J. Surg.**, Berlim, v. 26, n. 5, p. 592-597, 2002.

DA SILVA, S. R.; ÁVILA, F. F.; SOARES, M. B. O. Perfil hematológico e bioquímico sérico de pacientes submetidas à quimioterapia antineoplásica. **Rev. Enfermagem e Atenção à Saúde**, v. 2, n. 2, p. 32-45, 2013.

DEES, E. C. *et al.* Does information from axillary dissection change treatment in clinically node-negative patients with breast cancer? **Ann. Surg.**, Filadélfia, v. 226, n. 1, p. 279-287, 1997.

DEL DEBBIO, C. B.; TONON, L. M.; SECOLI, S. R. Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. **Rev. Gaúcha Enferm.**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 133-142, 2007.

DEROSSIS, A. M. *et al.* A trend analysis of the relative value of blue dye and isotope localization in 2,000 consecutive cases of sentinel node biopsy for breast cancer. **JACS**, Chicago, v. 193, n. 5, p. 473-478, 2001.

DIAS, A. A.; MAURO, M. N.; PUY, T. C.; OLIVEIRA, C. M.; FECURY, A. A.; DIAS, C. A. G. M.; DENDASCK, C. V. Atualização sobre os principais aspectos relacionados ao câncer de mama. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, São Paulo, v. 4, n. 8, p. 5-17, 2017.

DIMINO, M. L.; PALMER, A. F. Purification of bovine hemoglobin via fast performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdã, v. 856, n. 1, p. 353-357, 2007.

DISAIA, P. J.; CREASMAN, W. T.; RICH, W. M. An alternate approach to early cancer of the vulva. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, Amsterdã, v. 133, n. 7, p. 825-832, 1979.

DOWSETT, M.; HOUGHTON, J.; IDEN, C.; SALTER, J.; FARNDON, J.; AHERN, R. *et al.* Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according to estrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. **Ann. Oncol.**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 818-826, 2006.

EAST, J. M. *et al.* Sentinel lymph node biopsy for breast cancer using methylene blue dye manifests a short learning curve among experienced surgeons: a prospective tabular cumulative sum (CUSUM) analysis. **BMC surgery**, Boston, v. 9, n. 1, p. 2, 2009.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Aspectos gerais dos adenocarcinomas de mama, estadiamento e classificação histopatológica com descrição dos principais tipos. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, 2000.

ELMER, J.; BUEHLER, P. W.; JIA, Y.; WOOD, Fr.; HARRIS, D. R.; ALAYASH, A.; PALMER, A. F. Functional comparison of hemoglobin purified by different methods and their biophysical implications. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 106, n. 1, 2010.

ESTOURGIE, S. H. *et al.* Lymphatic drainage patterns from the breast. **Ann. Surg.**, Filadélfia, v. 239, n. 2, p. 232, 2004.

FELDEN, J. B.; FIGUEIREDO, A. C. Distribution of body fat and breast cancer: a case - control study in the South of Brazil. **Cien. Saude. Colet.**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 5, p. 2425-2433, 2011.

FERLAY, J. *et al.* **Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012.** Lyon, 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>. Acesso em: 19 set. 2017.

FERREIRA, B. P. S. **Morbidade cirúrgica pós - biópsia de linfonodo sentinela e esvaziamento axilar:** estudo comparativo em mulheres com e sem preservação do nervo intercostobraquial. 2008. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Programa de Pós-graduação em Patologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

FISHER, B. Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. **Cancer**, Atlanta, v. 40, n. 1, p. 574-587, 1977.

FISHER, B; ANDERSON, S; BRYANT, J; MARGOLESE, R. G.; DEUTSCH, M.; FISHER, E. R. *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. **N Engl J Med.**, Massachusetts, v. 347, n. 16, p. 1233-1241, 2002.

FISHER, E. R. *et al.* Laboratory and clinical research in breast cancer: a personal adventure: the David A. Karnofsky memorial lecture. **Cancer Res. Tr.**, Amsterdã, v. 40, n. 11, p. 3863-3874, 1980.

FOGAÇA, E. I. C.; GARROTE, L. F. Câncer de mama: atenção primária e detecção precoce. **Arq. Ciênc. Saúde**, São José do Rio Preto, v. 11, n. 3, p. 179-181, 2004.

FOWLER, J. E. Jr. Sentinel lymph node biopsy for staging penile cancer. **Urology.**, Tehran, v. 23, n. 4, p. 352-353, 1984.

FREITAS-JUNIOR, R.; GONZAGA, C.M.; FREITAS, N.M.; MARTINS, E.; DARDES, R.C. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics**, São Paulo, v. 67, n. 7, p. 731-737, 2012.

FREITAS-JUNIOR, R.; SIQUEIRA, L. B.; CARRIJO, E. N.; LACERDA, R. P.; PAULINELLI, R.R.; RAHAL, R. M. *et al.* Variação temporal do tratamento cirúrgico do câncer de mama em um hospital universitário na região Centro-Oeste do Brasil. **Rev. Col. Bras. Cir.**, São Paulo, 40, n. 3, p. 180-185, 2013.

FUHRMAN, G. M.; KING, T. A. Multidisciplinary breast management. **Surg. Clin. North. Am.**, Filadélfia, v. 93, n. 1, p. 17-18, 2013.

GADELHA, M. I. R.; COSTA, M. R.; ALMEIDA, R. T. Classification of Malignant Tumours - analysis and suggestions based on APAC data. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 193-199, 2005.

GALEB, N. A.; GARRIDO, M. M.; DE LUCA, L. A. *et al.* Estudos das Técnicas para Pesquisa do Linfonodo Sentinela no Câncer de Mama. **Rev. Bras. Mastologia**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 107-114, 2000.

GENÇ, F.; TAN, M. Symptoms of patient with lung cancer undergoing chemotherapy and coping strategies. **Cancer Nursing**, Nova Iorque, v. 34, n. 6, p. 503-509, 2011.

GIULIANO, A. E. *et al.* Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 18, n. 13, p. 2553-2559, 2000.

GIULIANO, A. E. Mapping a pathway for axillary staging: a personal perspective on the current status of sentinel lymph node dissection for breast cancer. **Archives of Surgery**, Lisle, v. 134, n. 2, p. 195-199, 1999.

GIULIANO, A. E.; KIRGAN, D. M.; GUENTHER, J. M.; MORTON, D. L. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. **Ann Surg.**, Filadélfia, v. 220, n. 1, p. 391-398, 1994.

GOLSHAN, M; NAKHLIS, F. Can methylene blue only be used in sentinel lymph node biopsy for breast cancer? **Breast J.**, Londres, v. 12, n. 5, p. 428-430, 2006.

GONÇALVES, L. L. C.; LIMA, A. V.; BRITO, E. S.; OLIVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, L. A. R.; ABUD, A. C. F.; DALTRO, A. S. T.; BARROS, A. M. M. S. & GUIMARÃES, U. V. Mulheres portadoras de câncer de mama: conhecimento e acesso às medidas de detecção precoce. **Rev. Enferm. UERJ**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 362-367, 2009.

GORDON-SMITH, T. Red blood cells. **Surgery**, Londres, v. 25, n. 2, p. 57-60, 2007.

GORDON-SMITH, T. Structure and function of red and white blood cells. **Medicine**, Massachusetts, v. 41, n. 4, p. 193-199, 2013. DOI: 10.1016/j.mpmed.2013.01.023.

GRANT, R. N.; TABAH, E. J.; ADAIR, F. E. The surgical significance of the subareolar lymph plexus in cancer of the breast. **Surgery**, Londres, v. 33, n. 1, p. 71-78, 1953.

GRAVERSEN, H. P. *et al.* Breast cancer: risk of axillary recurrence in node-negative patients following partial dissection of the axilla. **Eur. J. Surg. Oncol.**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 407-412, 1988.

GREENE, F. L; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D.; FRITZ, A.G.; BALCH, C. M.; HALLER, D. G.; MORROW, M. **AJCC cancer staging manual**. 6. ed. New York: Springer, 2002.

GUMUS, M. *et al.* How long will I be blue? Prolonged skin staining following sentinel lymph node biopsy using intradermal patent blue dye. **Breast Care**, Zurich, v. 8, n. 3, p. 199-202, 2013.

HADDAD, C. F. Trastuzumab no câncer de mama. **FEMMA**, Lavras, v. 38, n. 2, 2010. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/01007254/2010/v38n2/a001.pdf>. Acesso em: 20 set. 2017.

HALSELL, J. T. *et al.* Lymphatic drainage of the breast demonstrated by vital dye staining and radiography. **Ann Surg.**, Filadélfia, v. 162, n. 1, p. 221-6, 1965.

HAQUE, R. A.; WAGNER, A.; WHISKEN, J. A.; NASSER, S, M.; EWAN, P. W. Anaphylaxis to patent blue V: a case series and proposed diagnostic protocol. **Allergy**, Zurich, v. 65, n. 3, p. 396-400, 2010.

HARRELL, M. I; IRITANI, B. M; RUDDALL, A. Lymph node mapping in the mouse. **J. Immunol. Methods**. Berlin, v. 332, n. 1-2, p. 170-174, 2008.

HSIA, C. J. C.; ER, S. S.; HRONOWSKI, L. J.; PERSAUD, K.; ANSARI, M. R. ATP-hemoglobin purification by ATP agarose affinity chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdã, v. 381, n.1, p. 153–157, 1986.

HWANG, P. K.; GREER, J. Interaction between hemoglobin subunits in the hemoglobin haptoglobin complex. **J. Biol.**, Berlin, v. 255, n. 7, p. 3038-3041, 1980.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer**: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>. Acesso em: 16 set. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-estaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf. Acesso em: 20 jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Falando sobre câncer de mama**. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/falando_cancer_mama1.pdf. Acesso em: 15 set. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama**. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/fad72d004eb684b68b379bf11fae00ee/pncc_mama.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=fad72d004eb684b68b379bf11fae00ee. Acesso em: 20 set. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/fad72d004eb684b68b379bf11fae00ee/pnc_c_mama.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 20 set. 2017.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Tratamento Quimioterápico de Câncer de Mama**. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-quimioterapico-do-cancer-de-mama/1405/265/>. Acesso em: 20 set. 2017.

JIA, Y. *et al.* Haptoglobin preferentially binds β but not α subunits cross-linked hemoglobin tetramers with minimal tetramers with minimal effects on ligand and redox reactions. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e59841, 2013.

JIA, Y. *et al.* Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: A novel oxidative pathway. **J. Biol.**, Berlin, v. 282, n. 7, p. 4894-4907, 2007.

KALIMO, K.; JANSÉN, C. T.; KORMANO, M. Sensitivity to Patent Blue dye during skin-prick testing and lymphography. A retrospective and prospective study. **Radiology**, Oak Brook, v. 141, n. 2, p. 365-367, 1981.

KANAORI, K. *et al.* T-quaternary structure of oxy human adult hemoglobin in the presence of two allosteric effectors, L35 and IHP. **Biochim. Biophys. Acta Biomembr.**, Amsterdã, v. 1807, n. 10, p. 1253-1261, 2011.

KARGER, S.; FREIBURG, G. H. Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Breast Care**, Zurich, v. 5, n. 3, p. 185-187, 2010.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

KAWASHIMA, A. *et al.* Imaging of nontraumatic hemorrhage of the adrenal gland. **Radiographics**, Oak Brook, v. 19, n. 1, p. 949–963, 1999.

KIMURA, T., SATO, K., SUGIMOTO, K., TAO, R., MURAKAMI, T., KUROSAKI, Y., NAKAYAMA, T. Oral administration of insulin as poly (vinyl alcohol) - gel spheres in diabetic rats. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 19, n. 1, 897-900, 1996.

KLIMBERG, V. S. *et al.* Subareolar versus peritumoral injection for location of the sentinel lymph node. **Ann. Surg.**, Filadélfia, v. 229, n. 6, p. 860, 1999.

KLINKEN, S. P. Red blood cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Amsterdã, v. 34, n. 1, p. 1513–1518, 2002. DOI: 10.1016/S1357-2725(02)00087-0.

KLUTHCOVSKY, A. C.; FARIA, T. N.; CARNEIRO, F. H.; STRONA, R. Female breast cancer mortality in Brazil and its regions. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 60, n. 4, p. 387-393, 2014.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Crit. Rev. Biochem. Mol.**, London, v. 38, n. 1, p. 61-88, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LANGGUTH, P. *et al.* The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 39-57, 1997.

LATHE, G. H.; RUTHVEN, C. R. J. The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. **Biochem. J.**, Londres, v. 62, n. 4, p. 665-674, 1956.

LAZARETTI, A. P. *et al.* Prevalência dos subtipos histológicos do câncer de mama em pacientes atendidas em um serviço de oncologia de alta complexidade e demanda do sul de Santa Catarina de 2006 a 2014. *In*: CONGRESSO GAÚCHO DE CLÍNICA MÉDICA, 13., 2016, São Paulo. **Anais [...]**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 117-121.

LEE, C. J.; KAN, P. **Hemoglobin purification**. Depositante: Olivers and Belval. n. EP0729475A1. Depósito: 23 jul. 1993. Concessão: 11 nov. 1993.

LEE, G. R. Hemolytic disorders: general considerations. *In*: LEE, G. R.; FOERSTER, J. *et al.* (org.). **Wintrobe's clinical hematology**. 10. ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1999.

LEONG, S. P. *et al.* Is breast cancer the same disease in Asian and Western countries? **World J. Surg.**, Berlim, v. 34, n. 10, p. 2308-2324, 2010.

LERNEVALL, A. Imaging of axillary lymph nodes. **Acta Oncol.**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 277-281, 2000.

LI, T. *et al.* A method for purification and viral inactivation of human placenta hemoglobin. **Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.**, London, v. 34, n. 1, p. 175–188, 2006.

LIAU, C. Y. *et al.* Purification of human plasma haptoglobin by hemoglobin-affinity column chromatography. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, London, v. 790, n. 1, p. 209–216, 2003.

LIM, E. T. *et al.* Pathological axillary lymph nodes. **Acta Oncol.**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 277-81, 2000.

LIMAN, G. H. *et al.* Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 32, n. 13, p. 1365-83, 2014.

LIU, T. J.; WANG, S. J.; TSAI, S. C. Lymphoscintigraphy using larger colloid particles may enhance visualization of the sentinel node in breast cancer: a case report. **Clin. Nucl. Med.**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 191-192, 2000.

LLOYD, M. C. *et al.* Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: How reliable is it? **J. Pathol. Inform.**, Pittsburg, v. 1, n.1, p. 29-36, 2010.

LONGO, Dan L. *et al.* **Medicina interna de Harrison**. 18. ed. Porto Alegre: AMGH, 2013.

LU, X.; ZHAO, D.; SU, Z. Purification of hemoglobin by ion exchange chromatography in flow-through mode with PEG as an escort. **Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.**, Abingdon, v. 32, n. 1, p.209-227, 2004.

LUDEWIG, S.; FRANZ, S. W. Hemosiderin V: The occurrence of heme and lipids in hemosiderin. **Arch. Biochem.**, Nova Iorque, v. 138, n. 1, p. 397- 407, 1970.

LUFKIN, R. B. **Manual de Ressonância Magnética**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1999.

LYMAN, G. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 23, n. 30, p. 7703-20, 2005.

- MAGALDI, C. M. *et al.*, Avaliação da morbidade e funcionalidade do membro superior em mulheres submetidas à linfadenectomia axilar total e biópsia de linfonodo sentinela por câncer de mama. **Rev. Bras. Mastologia**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 9-14, 2005.
- MAINES, M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. **Annu. Rev. Pharmacol.**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 517-554, 1997.
- MAINES, M. D. The heme oxygenase system: update 2005. **Antioxid. Redox Signal**, Nova Iorque, v. 7, n. 11-12, p. 1761-1766, 2005.
- MANSEL, R. E.; GOYAL, A. European studies on breast lymphatic mapping. **Seminars in Oncology**, London, v. 31, n. 3, p. 304-310, 2004.
- MARANHÃO, M. V. M. *et al.* Allergic reaction to patent blue dye in breast surgery – case report Brazilian. **Braz. J. Anesthesiol.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 433-436, 2016.
- MARIANI, G. *et al.* Radioguided Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer Surgery. **Clin. Nucl. Med.**, Philadelphia, v. 42, n. 8, p. 1363-1400, 2001.
- MARTA, G. N.; HANNA, S. A.; HANNA, M. E.; SILVA, J. L. F.; CARVALHO, E. A. Câncer de mama estágio inicial e radioterapia: atualização. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 468-474, 2011.
- MARTINS. *et al.* Evaluation of adrenal tumors by magnetic resonance imaging with histological correlation. **Radiol. Bras.**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 55-62, 2008.
- MATTES, M. D. *et al.* Breast cancer subtype as a predictor of lymph node metastasis according to the SEER registry. **J. Breast Cancer.**, Seoul, v. 18, n. 2, p. 143–148, 2015.
- MAYES, E.; DOUEK, M.; PANKHURST, Q. Surgical magnetic systems and tracers for cancer staging. *In*: THANH, N. T. K. (org.). **Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications**. New York: CRC Press, 2012.
- MAZA, S. *et al.* Peritumoural versus subareolar administration of technetium-99m nanocolloid for sentinel lymph node detection in breast cancer: preliminary results of a prospective intra-individual comparative study. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, Vienna, v. 30, n. 5, p. 651-656, 2003.
- MCKAY, R. H.; FINEBERG, R. A. Horse spleen hemosiderin: I. Isolation. **Arch. Biochem. Biophys.**, London, v. 104, n. 1, p. 487-495, 1964.
- MCMASTERS, K. M.; WONG, S. L.; MARTIN, R. C. Dermal injection of radioactive colloid is superior to peritumoral injection for breast cancer sentinel lymph node biopsy: results of a multiinstitutional study. **Ann. Surg.**, Filadélfia, v. 233, n. 5, p. 676, 2001.

MENKE, C. H. *et al.* Tumor size as a surrogate end point for the detection of early breast cancer: a 30-Year (1972–2002), single-center experience in southern Brazil. **Breast J.**, London, v. 13, n. 5, p. 448-56, 2007.

MERTES, P. M. *et al.* Anaphylaxis to dyes during the perioperative period: reports of 14 clinical cases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, Maryland Heights, v. 122, n. 2, p. 348-352, 2008.

MIGOWSKI, A. *et al.* Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil. III - Desafios à implementação. **Cad. Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v.34, n.6, p:e00046317, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00046317>. Acesso em: 21 set. 2017.

MOLINA, L.; DALBEN, I.; DE LUCA, L. A. Análise das oportunidades de diagnóstico precoce para as neoplasias malignas de mama. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 49, n. 2, p. 185-190, 2003.

MORISHITA, I. *et al.* Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 78, p. 9-16, 1992.

MORROW, M. *et al.* Learning sentinel node biopsy: results of a prospective randomized trial of two techniques. **Surgery**, Londres, v. 126, n. 4, p. 714-722, 1999.

MULLAN, M. H.; DEACOCK, S. J.; KISSIN, M. W. Anaphylaxis to patent blue dye during sentinel lymph node biopsy for breast cancer. **Eur. J. Surg. Oncol.**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 218-219, 2001.

NAGEL, R. L.; GIBSON, Q. H. The binding of hemoglobina to haptoglobina and its relation to subunit dissociation of hemoglobina. **J. Biol.**, Berlin, v. 246, n. 1, p. 69-73, 1971.

NARD, R. P. **Análise da frequência e determinação imuno-histoquímica dos carcinomas mamários receptor de estrogênio negativo e receptor de progesterona positivo.** Dissertação (Mestrado em) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

NASCIMENTO, F. B.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo. **Arq. Med.**, Porto, v. 29, n. 6, p. 153-159, 2015.

NATHANSON, S. D. *et al.* Pathways of lymphatic drainage from the breast. **Ann. Surg. Oncol.**, Berlin, v. 8, n. 10, p. 837-843, 2001.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **Breast Cancer – Locally Advanced (Stage III).** Version 1. Plymouth Meeting, 2017. Disponível em: https://www.nccn.org/patients/guidelines/stage_iii_breast/files/assets/common/downloads/files/stageiiibreast.pdf. Acesso em: 13 set. 2017.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **Linhas de orientação para doentes:** Cancro da mama. Plymouth Meeting, 2011. Disponível em: <https://www.nccn.org/patients/guidelines/pdf/breast-portuguese.pdf>. Acesso em: 23 set. 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: W. H. F. Company, 1993.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIELSEN, M. J.; MOLLER, H. J.; MOESTRUP, S. K. Hemoglobin and heme scavenger receptors. **Antioxid. Redox Signal**, Nova Iorque, v. 12, n. 2, p. 261-273, 2010.

NIEWEG, O. E. *et al.* Rationale for superficial injection techniques in lymphatic mapping in breast cancer patients. **J. Surg. Oncol.**, New York, v. 87, n. 4, p. 153-156, 2004.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* Experimental model in the rat for sentinel node biopsy. Comparison between dextran and phytate. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 18, edição especial, p. 15-21, 2003.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Câncer de mama é a 2ª principal causa de morte entre mulheres nas Américas; diagnóstico precoce e tratamento podem salvar vidas**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5273:cancer-de-mama-e-a-2a-principal-cao-de-morte-entre-mulheres-nas-america-diagnostico-precoce-e-tratamento-podem-salvar-vidas&Itemid=839. Acesso em: 16 set. 2017.

ORUCEVIC, A; REDDY, V. B.; BLOOM, K. J. *et al.* Predictors of lymph node metastasis in t1 breast carcinoma, stratified by patient age. **Breast J.**, Londres, v. 8, n. 6, p. 349-355, 2002.

PAGANELLI, G. *et al.* Optimized sentinel node scintigraphy in breast cancer. **Q. J. Nucl. Med. Mol. Im.**, Turin, v. 42, n. 1, p. 49, 1998.

PARSLOW, T. G.; STITES, D. P. **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

PAZ, W. A. *et al.* Sentinel lymph node biopsy - clinical experience. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

PEREZ, E. A. *et al.* Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. **J. Clin. Oncol.**, Alendraxia, v. 29, n. 25, p. 3366-3373, 2011.

PIMENTEL, M. D.; SANTOS, L. C.; GOBBI, H. Avaliação clínica da dor e sensibilidade cutânea de pacientes submetidas à dissecação axilar com preservação do nervo intercostobraquial para tratamento cirúrgico do câncer de mama. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 6, p. 291-296, 2007.

PINHEIRO, L. G. *et al.* Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 24, n. 6, p. 432-436, 2009.

PINHEIRO, L. G. P. *et al.* Sentinel lymph node biopsy: actual topics. *In*: DONE, S. (org.). **Breast Cancer: Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics**. California: Intech Open, 2010, p. 397-428.

PINHEIRO, L. G. P; ALVES, M. M. **Marcador biológico para identificação do linfonodo sentinela do quadrante superior externo da mama e processo de obtenção**. Depositante: Luiz Gonzaga Porto Pinheiro. BR 10 2012 015805 1 A2. Depósito: 26 jun. 2012. Concessão: 08 jul. 2014.

PINHEIRO, L. G. P. *et al.* Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc 99m. **Acta Bras. Cir.**, São Paulo, v. 18, n. 6, p. 545-552, 2003.

PIOMELLI, S.; SEAMAN, C. Mechanism of red blood cell aging – relationship of cell-density and cell age. **Am. J. Hematol.**, Hoboken, v. 42, n. 1, p. 46-52, 1993.

QUADROS, L. G. A.; GEBRIM, L. H. The sentinel lymph node biopsy in breast cancer in the practice of the Brazilian gynecologist: a revision. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 3, p. 158-164, 2007.

RAKHA, E. A.; ELLIS, I. O. Classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. **Adv. Anat. Pathol.** Hoboken, v. 18, n. 4, p. 255-267, 2011.

RESCIGNO, J.; ZAMPELL, J. C.; AXELROD, D. Patterns of axillary surgical care for breast cancer in the era of sentinel lymph node biopsy. **Ann. Surg. Oncol.**, Berlin, v. 16, n. 3, p. 687- 696, 2009.

RIBEIRO, J. I. Carcinoma da mama: Estado da arte. **Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2014.

RICC, I.; SUSAN S. **Enfermagem materno-neonatal e saúde da mulher**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

ROBINSON, S. H. Formation of bilirubin from erythrocyte and non-erythroid sources. **Semin Hematol.**, Amsterdã, v. 9, n. 1, p. 43-53, 1972.

RODWELL, V. *et al.* **Harper's Illustrated Biochemistry**. 30. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2015.

ROSES, D. F. Development of modern breast cancer treatment. *In*: ROSES, D. F. **Breast Cancer**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005.

RUTGERS, E. J. Guidelines to assure quality in breast cancer surgery. **Eur. J. Surg. Oncol.**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 568-576, 2005.

SAHIN, A. *et al.* A new affinity gel for the purification of α -carbonic anhydrases. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, London, v. 30, n. 1, p. 224-228, 2014.

SAITO, H. Metabolism of Iron Stores. **Nagoya J. Med. Sci.**, Nagoya, v. 76, n. 1, p. 235-254, 2014.

SAKUMA, A.; OTTOBONI, M. A. P.; SIERRA, P. C. **Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes**. São Paulo: RedSang-Sibratec, 2011.

SALHAB, M; AL SARAKBI, W; MOKBEL, K. Skin and fat necrosis of the breast following methylene blue dye injection for sentinel node biopsy in a patient with breast cancer. **Int. Semin. Surg. Oncol.**, London, v. 2, n. 26, 2005. DOI: 10.1186/1477-7800-2-26. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308848/>. Acesso em: 16 ago. 2020.

SALLES, M. A. *et al.* Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 3, p. 213-222, 2009.

SANTOS, M. N. N. Haptoglobin: An emerging candidate for phenotypic modulation of sickle cell anemia? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 361-363, 2015.

SCHAER, D. J. *et al.* Hemolysis and free hemoglobina revisited: Exploring hemoglobina and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blood**, Washington, v. 121, n. 8, p. 1276-1284, 2013.

SCHAER, D. J. *et al.* CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. **Blood**, Washington, v. 107, n. 1, p. 373-380, 2006.

SCHERER, K. *et al.* Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, Arlington Heights, v. 96, n. 3, p. 497-500, 2006.

SHAH, D.R. *et al.* Utilization of lymph node assessment in patients with ductal carcinoma in situ treated with lumpectomy. **J. Surg. Res.**, Los Angeles, v. 177, n. 1, p. 21-26, 2012.

SHWARTZ, G. F. *et al.* Proceedings of the Consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast. **Cancer**, Philadelphia, v. 94, n. 10, p. 2542-2551, 2002.

SILVA JÚNIOR, J. G. **Eletroforese de proteínas**: Guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

SILVA, C. B.; ALBUQUERQUE, V.; LEITE, J. Qualidade de Vida em Pacientes Portadoras de Neoplasia Mamária Submetidas a Tratamentos Quimioterápicos. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 2, p. 227-236, 2010.

SILVA, C. *et al.* Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 125-140, 2002.

SIMMONS, R. *et al.* Methylene blue dye as an alternative to isosulfan blue dye for sentinel lymph node localization. **Ann. Surg. Oncol.**, Berlin, v. 10, n. 3, p. 242–247, 2003.

SOERJOMATARAM, I. *et al.* An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. **Breast Cancer Res. Tr.**, Amsterdã, v. 107, n. 3, p. 309-30, 2008.

SOUZA, H. P. G. *et al.* É necessária a biópsia do linfonodo sentinela no carcinoma ductal *in situ* da mama? **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 1, p. 37-42, 2015.

SPENCE, R. A. J.; JOHNSTON, P. G. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.

STEWART, B. W; WILD, C. P. **World Cancer Report**: 2014. Lyon, 2014. Disponível em:
<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml#panelResulta>. Acesso em: 16 set. 2017.

STRAVER, M. E. *et al.* Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. **Ann Surg.**, Filadélfia, v. 17, n. 7, p. 1854-1861, 2010.

SUN, G.; PALMER, A. F. Preparation of ultrapure bovine and human hemoglobin by anion exchange chromatography. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, London, v. 867, n. 1, p. 1–7, 2008.

TANIS, P. J. *et al.* Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. **JACS**, Chicago, v. 192, n. 3, p. 399-409, 2001.

TARRICONE, V. J. *et al.* Impregnação de tegumento após o uso do azul patente na identificação do linfonodo sentinela em câncer de mama. Relato de caso. **Revista Científica de la Federación Latinoamericana de Mastología**, [s. l.], v. 6, n. 2, 2012.

TEICHER, I; POULARD, B; WISE, L. Preservation of the intercosto brachial nerve during axillary dissection for carcinoma of the breast. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Washington, v. 155, n. 1, p. 891-892, 1982.

THILL, M. *et al.* The Central-European SentiMag study: sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope. **Breast J.**, Londres, v. 23, n. 2, p. 175-179, 2014.

THULER, L. C. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. **Rev. Bras. Cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 4, p. 227-238, 2003.

TIEZZI, D. G. Cirurgia conservadora no câncer de mama. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 428-34, 2007.

TORREZAN, R. Z. *et al.* Preservation of intercostobrachial nerve during axillary clearance for breast cancer. **RBGO**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 221-226, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v24n4/a02v24n4>. Acesso em: 21 set. 2017.

TURNER-WARWICK, R. The lymphatics of the breast. **Brit. J. Surg.**, v. 46, n. 200, p. 574-582, 1959.

TUTTLE, T. M. Technical advances in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. **Am. Surgeon**, v. 70, n. 5, p. 407, 2004.

URBAN, C. A. *et al.* Sentinel lymph node: a new concept in surgical treatment of breast câncer. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 28, n.3, p. 216-222, 2001.

VALLEJOS *et al.* Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. **Clin. Breast Cancer**, Londres, v. 10, n. 4, p. 294-300, 2010.

VARGHESE, P. *et al.* Methylene blue dye versus combined dye-radioactive tracer technique for sentinel lymph node localisation in early breast cancer. **EJSO**, London, v. 33, n. 2, p. 147-152, 2007.

VASQUES, P. H. *et al.* Comparison between hemosiderin and Technetium -99 in sentinel lymph node in human breast cancer. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 30, n. 11, p. 785-790, 2015.

VASQUES, P. H. D. **Comparação da hemossiderina com o tecnécio - 99 na identificação do linfonodo sentinela do câncer de mama.** 2016. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

VERONESI, U. Conservative treatment of breast cancer: a trial in progress at the Cancer Institute of Milan. **World J. Surg.**, Berlim, v. 1, n. 3, p. 324-326, 1977.

VERONESI, U. *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 347, n. 16, p. 1227-1232.

VIALE, G. *et al.* Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v. 25, n. 25, p. 3846–3852, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WEIR, M. P.; GIBSON, J. F.; PETERS, T. J. Haemosiderin and tissue damage. **Cell Biochem. Funct.**, Birmingham, v. 2, n. 4, p. 186-194, 1984.

WETZ, C. E.; GAWRYL, M. S. Separation of hemoglobin from unpolymerized hemoglobin on hydroxyapatite using HPLC. Depositante: Curtis E. Wertz; Maria S. Gawryl. n. US5691453A. Depósito: 07 jun. 1995. Concessão: 25 nov. 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. São Paulo, 2012. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. Acesso em: 16 set. 2017.

WILKE, L. G. *et al.* Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. **Ann Surg.**, Filadélfia, v. 13, n. 4, p. 491-500, 2006.

WOHRL, S. *et al.* **Near-fatal anaphylaxis to patent blue V**. Oxford, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2133.2004.05931.x>. Acesso em: 20 set. 2017.

WONG, S. L. *et al.* Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: impact of the number of sentinel nodes removed on the false-negative rate. **JACS**, Chicago, v. 192, n. 6, p. 684-689, 2001.

WOYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. Specific surgical operations. *In*: WAYNFORTH, H. B. **Experimental and surgical technique in the rat**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 257-263.

YOSHINARI, S. T. V. *et al.* Vivência de mulheres frente ao câncer de mama: revisão da literatura brasileira. **Rev. Ciênc. Saúde**, Itajuba, v. 7, n. 4, p. 20-25, 2017.

ZUO, W.; WANG, Y.; LI, M. Clinical significance of sentinel lymph node biopsy for breast cancer. **Chinese Journal of Oncology**, Beijing, v. 23, n. 1, p. 247-250, 2001.

APÊNDICE A – ORIGINAL ARTICLE “COMPARISON BETWEEN HEMOSIDERIN AND TECHNETIUM-99 IN SENTINEL LYMPH NOPE BIOPSY IN HUMAN BREAST CANCER”

10 - ORIGINAL ARTICLE
CLINICAL INVESTIGATION

Comparison between hemosiderin and Technetium-99 in sentinel lymph node biopsy in human breast cancer¹

Paulo Henrique Diógenes Vasques¹, Mayara Maia Alves¹, Raniere Gurgel Furtado de Aquino^{III}, Roberto Vitor Almeida Torres^{IV}, José Lucas Martins Bezerra^V, Luis Porto Brasileiro^V, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro^{VI}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020150110000010>

^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza-CE, Brazil. Conception and design of the study, acquisition of data, manuscript writing

^{II}Fellow PhD degree, Postgraduate Program in Biotechnology, Renorbio, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Conception and design of the study, acquisition of data, manuscript writing

^{III}Fellow Master degree, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Manuscript writing, critical revision.

^{IV}Graduate student, Medicine Faculty, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Acquisition of data.

^VGraduate student, Medicine Faculty, INTA, Sobral-CE, Brazil. Acquisition of data.

^{VI}Chairman, Full Professor, Department of Surgery, Medicine Faculty, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Intellectual, scientific, conception and design of the study

ABSTRACT

PURPOSE: To assess the safety and potential equivalence of the use of hemosiderin compared to the Technetium-99 in sentinel lymph node biopsy in human breast cancer.

METHODS: Non-random sample of 14 volunteer women diagnosed with breast cancer with primary tumors (T1/T2) and clinically tumor-free axilla were submitted to the identification of sentinel lymph node using hemosiderin obtained from autologous blood injected in the periareolar region 24h before surgery on an outpatient basis. Patients received preoperative subareolar intradermal injection of Technetium-99 in the immediate preoperative period. Patients were submitted to sentinel lymph node biopsy, with incision in the axillary fold guided by Gamma-Probe, dissection by planes until the identification of the point of maximum uptake of Technetium-99, identifying the marked nodes and their colors. All surgical specimens were sent for pathological and immunohistochemical study.

RESULTS: The results showed no evidence of side effects and/or allergic and non-allergic reactions in patients submitted to SLNB with hemosiderin. The SLN identification rate per patient was 100%. SLNB identification rate per patient with hemosiderin was the same as that of Technetium, with a concordance rate of 100% between the methods.

CONCLUSION: Hemosiderin is a safe dye that is equivalent to Technetium in breast sentinel lymph node biopsy.

Key words: Breast Neoplasms. Sentinel Lymph Node Biopsy. Hemosiderin. Technetium.

Vasques PHD *et al.*

Introduction

The Sentinel Lymph Node (SLN) is the first lymph node to receive lymphatic drainage from the site of a primary tumor, a concept established since 1977 by Cabanas, who introduced the sentinel lymph node biopsy (SLNB) in penile carcinoma¹. In 1993, Krag *et al.*² used the technetium-99 (⁹⁹Tc) in SLNB for melan. In 1994, Giuliano, using the patent blue dye in breast tumor, validated the concept of sentinel lymph node (SLN) in breast cancer³. In 2003, Veronesi⁴ established that SLNB was a safe and accurate method of screening axillary nodes for metastasis in women with small breast tumors. Recently, SLNB has replaced axillary dissection in early-stage breast cancer in clinically tumor-free patients⁵.

The association of ⁹⁹Tc with the blue dye allowed a more accurate identification in SLNB^{6,7}. Other dyes can also be used in SLN identification during the surgical procedure, such as methylene blue, patent blue, and isosulfan blue⁸ however, such substances – in a recent literature review – revealed a significant number of hypersensitivity reactions^{9,10}. Patent blue dye can cause from subtle adverse effects, such as skin rash, to severe reactions of anaphylaxis^{11,12}. The use of methylene blue may be associated with serious complications such as skin and fat necrosis at the injection site¹³. Anaphylactic reactions to isosulfan blue or patent blue in patients submitted to SLNB range from 0.6% to 2.7%¹⁴.

Identifying substances with fewer side effects and/or allergic reactions in SLNB is a challenge. In 2009, Pinheiro *et al.*¹⁵ proved, in an experimental research with animals, the efficacy of hemosiderin (a protein resulting from the degradation of hemoglobin that is commonly found in lysosomes of histiocytes and Kupffer cells) as an autologous dye in SLNB of female dogs' breasts. In the present study, the association of hemosiderin with ⁹⁹Tc presented similar results in the SLNB when compared to patent blue and ⁹⁹Tc. Hemosiderin has been experimentally proven to be a potential alternative to the current dyes.

The purpose of the present research was to assess the safety and potential equivalence of the use of hemosiderin in SLNB in human breast cancer compared to the gold standard test, the ⁹⁹Tc.

Methods

This non-randomized prospective clinical study conducted with human subjects was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará on August 10, 2010, No. 0730710. The surgical procedures were carried out at the Maternidade Escola Assis Chateaubriand – MEAC and Hospital Universitário Walter Cantídio by one single surgeon in the period from September 2011 to November 2013.

The non-random sample comprised 14 women from the phase I clinical trial who were selected in the mastology outpatient clinic of the MEAC and had a confirmed histopathologic diagnosis of breast cancer, with primary tumors (T1/T2) and clinically tumor-free axilla; women were of different ages, weighted over 50 kg, and had an indication for SLNB (Table 1).

Each patient was informed about the procedures and signed a free informed consent form prior to research participation. A week before the start of the study, all the participants underwent preoperative clinical and laboratory assessment, which showed they were able to undergo the surgical procedure. The iron metabolic profile was also assessed previously through complete blood count, serum iron, serum ferritin, transferrin saturation, and total iron-binding capacity.

Preparation, administration and production of hemosiderin

The preparation of the autologous dye derived from blood – hemosiderin – for use in the present study was obtained from a sample of 16ml of peripheral blood collected 24h before surgery. The peripheral blood drawn from the patient was inserted into two BD Vacutainer[®] tubes with Buffered Sodium Citrate aseptically. Then, the blood was centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes at 22°C. The centrifuged material separated into three phases in the test tube. The upper and intermediate layers (serum) were discarded and the bottom layer (red blood cells – RBCs) was diluted with normal saline (0.9% NaCl) in equal volume (ml) followed by manual homogenization in laminar flow biological safety cabinet. The resulting solution was centrifuged (3800 rpm for 3 minutes) again, with the appearance of two phases – the first was discarded, and the volume withdrawn was replaced with double-distilled water in the laminar flow cabinet, causing hemolysis of RBCs. The third and final centrifugation (3800 rpm for 3 minutes) yield one single phase of lysed RBCs suspended in the reddish liquid. This hemolysate, rich in hemoglobin, which contains iron, when injected in the breast is phagocytosed by macrophages of the Reticuloendothelial System that, through the lymphatic system, saturate the sentinel lymph node of ferric hydroxyphosphate micelles, which accumulate, resulting in the formation of hemosiderin. Sterility assurance was controlled with blood cultures to detect bacteria and fungi.

Hemosiderin was injected on an outpatient basis, with the patient in supine position, aseptically of the injection site with 70% alcohol, local anesthesia with 2% lidocaine without adrenaline, in the external periareolar region of the breast (3h) via a single puncture. After that, we performed a subareolar injection of 4ml of the dye and, after removal of the needle, we pressed the puncture hole with cotton for 1 minute (Figure 1A-B).

Comparison between hemosiderin and Technetium-99 in sentinel lymph node biopsy in human breast cancer

Patients were hospitalized and assessed as for the presentation of side effects for 24 hours. Two hours before the surgical procedure, the patient was taken to the imaging center of the clinic and underwent breast Magnetic Resonance Imaging (MRI) and received preoperative subareolar intradermal injection of 0.2ml of ⁹⁹Tc and mammary scintigraphy. After imaging tests, the patients were taken to the operating room where they, under general anesthesia, underwent the surgical procedure.

Sentinel lymph node biopsy

Patients were submitted to SLNB, with incision in the axillary fold guided by Gamma-Probe and dissection by planes until the identification of point of maximum uptake of ⁹⁹Tc, identifying the marked nodes and their colors (Figure 1C-D). After removal of lymph nodes, we assessed in each one the detection intensity of ⁹⁹Tc by the gamma-probe and the hemosiderin level of marking using a color scale from red to black (Figure 2). These data were recorded in a data collection form for further analysis. All surgical specimens were sent for pathological and immunohistochemical study. The patients were monitored throughout the procedure,

since the injection of hemosiderin until the postoperative period and their return within 7, 15 and 30 days after surgery (Figure 3).

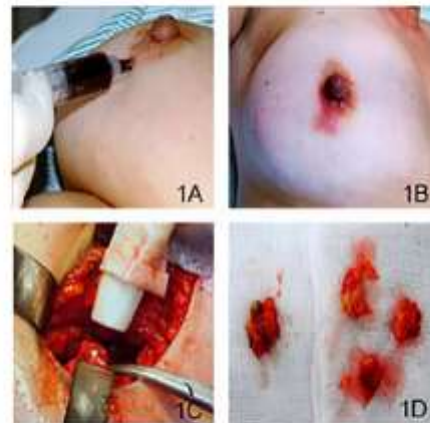


FIGURE 1 – Procedures: (A) Subareolar injection of hemosiderin. (B) Site after injection of hemosiderin (small bruise). (C) Identification of sentinel lymph node with the Gamma-Probe. (D) Sentinel lymph nodes marked with hemosiderin.



FIGURE 2 – Macroscopic aspect of the SLN color: (A) Lymph node without hemosiderin. (B) Lymph node marked with hemosiderin and the comparative scale of color intensity ranging from red to black.



FIGURE 3 – Study flowchart.

Results

Fourteen patients underwent SLNB with hemosiderin according to the method described. The mean age of patients was 54.3 years and the postmenopausal status was prevalent in 50% of the sample. Regarding histological type, twelve patients (85%) were diagnosed with invasive ductal carcinoma. As for the histological grade, there was a predominance of grade 2 tumors (60%) (Table 1).

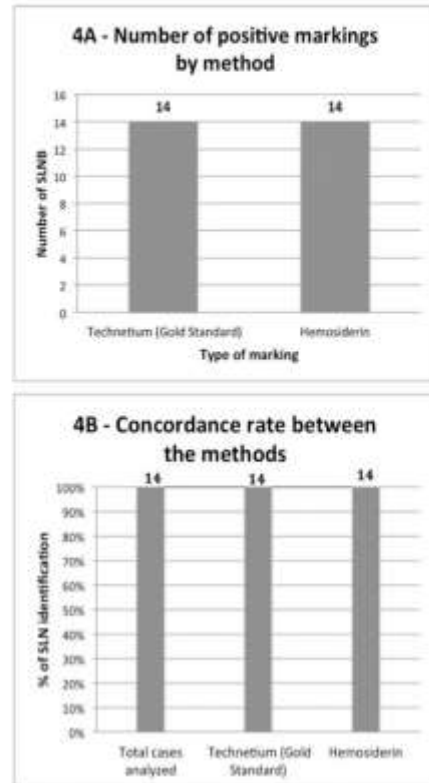
There was no evidence of side effects, allergic reactions,

surgical infection or toxicity in patients submitted to SLNB with hemosiderin in our study.

The efficacy of SLNB with hemosiderin was confirmed by determining the equivalence of hemosiderin compared to the marking technique using ⁹⁹Tc, which revealed a similar detection of SLN marked with hemosiderin and ⁹⁹Tc in all the patients. The SLN identification rate was 100%, with an average of 2.5 SLN found per patient. The study identified the SLN marked with hemosiderin in 100% of cases (Figure 4).

TABLE 1 - Patient and tumor characteristics of the 14 patients included. Results are given as mean values or frequencies in %.

Characteristic	Value
Age	54.3 y (range 36 - 85 y)
Height	156.4 cm (range 143 - 172 cm)
Weight	68.4 kg (range 48 - 88 kg)
Body mass index (BMI)	27.8 (range 22.1 - 33.5)
Menopausal status	
Premenopause	4(28%)
Perimenopause	3(22%)
Postmenopause	7(50%)
Carcinoma type	
Invasive carcinoma	12(85%)
Ductal carcinoma in situ	2(15%)
Tumor location	
Upper-outer quadrant	6(42%)
Upper-inner quadrant	2(14%)
Lower-inner quadrant	2(14%)
Lower-outer quadrante	4(30%)
Central	0(0%)
Pathological tumor size	
pTis	2(15%)
pT1a	1(7%)
pT1b	0(0%)
pT1c	6(43%)
pT2	5(35%)
pT3	0(0%)
Pathological lymph node status	
pN0	10(72%)
pNi	0(0%)
pN1mi	1(7%)
pN1a	2(14%)
pN1b	1(7%)
pN2a	0(0%)
Grading	
G1	2(16.7%)
G2	9(60%)
G3	3(23.3%)
Hormone receptor statu	
Estrogen receptor (ER)	12 (86%)
Progesterone receptor (PR)	12 (86%)
HER2 status	
HER2	0(0%)

**FIGURE 4** - (A) SLN marked with hemosiderin and ^{99m}Tc per patients*. (B) Concordance rate between hemosiderin and ^{99m}Tc . *The average number of SLN found per patients was 2.5.

Each patient submitted to SLNB had their lymph nodes classified in percentage terms according to the shades of color found: no color-0% (n=0); light red-16% (n=2); dark-red 64% (n=8) and black-16% (n=2) (Table 2). In 100% of cases (n=14), the SLN were marked and identified by gamma-probe with ^{99m}Tc .

TABLE 2 – Shades of color of lymph nodes.

Color of Lymph Node/patients	Frequency
No color	0 (0%)
Light red	2 (16%)
Dark red	8 (64%)
Black	2 (16%)

Discussion

Currently, the gold standard in the SLNB is the use of radiotracer ^{99m}Tc /gamma-probe technique in combination with blue dye⁷. Disadvantages of these techniques, as well as the

Comparison between hemosiderin and Technetium-99 in sentinel lymph node biopsy in human breast cancer

publication of adverse effects and allergic reactions associated with dyes, which are life threatening, have led to new research as an alternative to improve and even substitute existing methods.

The use of blue dyes for SLNB has increased worldwide. Sleth *et al.*³⁹, in their work, have reported an annual increase in the incidence of adverse reactions and increased risk of allergic reactions associated with the blue dyes; therefore, they questioned if it was not the time to change the dye. This restlessness was one of the motivations to study hemosiderin – in the present clinical study – as a dye that can substitute artificial dyes for SLNB.

Pinheiro *et al.*¹⁷ have tested the feasibility of hemosiderin in laboratory as an autologous dye, compared to patent blue, for breast SLNB in a canine model. Given that original study, it was possible to base and test the use of hemosiderin for SLNB in breast cancer in women, revealing an equivalence of hemosiderin and ⁹⁹Tc with a concordance rate of 100% of the cases and an average of 2.5 SLN per patients. These findings put hemosiderin on the same level of ⁹⁹Tc, a widely used substance that is currently the “gold standard” in SLNB worldwide⁷.

As this is a phase I clinical trial with a sample of 14 women and with the aim to establish the clinical safety of the substance tested and the potential equivalence to ⁹⁹Tc, its findings open a promising direction for new studies on the use of hemosiderin in the SLNB in breast cancer with larger samples and the possibility to extend its indication to other tumor sites that employ the SLNB.

In the present study, hemosiderin was administered 24 hours before the procedure, as recommended by Pinheiro *et al.*¹⁷, who demonstrated that this interval allowed a stronger coloring of SLN. This interval has enabled the monitoring of possible reactions during the administration of the substance tested as well as in the preoperative hospital stay. As it is an autologous dye, no signs or symptoms of allergies were observed during the administration of hemosiderin in the perioperative and/or postoperative period. This fact places hemosiderin as a safe dye, unlike the blue dyes, which are reported by several studies as presenting allergic reactions in SLNB, with an estimated prevalence of 0.6%-2.7%^{6,10,17,20}. These reactions, in addition to putting patients' lives at risk, can hinder and complicate anesthesia, requiring from the medical staff therapeutic and resuscitative measures that, depending on the severity of the condition, may increase surgical duration, cancel the surgical procedure, and even lead to death. Therefore, the safety of hemosiderin can decrease personal and health spendings, reduce the morbidity of the procedure and emotional suffering, along with other indirect advantages^{4,10,17,20}.

Non-allergic reactions associated with the blue dyes are complications that add difficulties and consequences to the

SLNB procedure. The main ones are: interference with pulse oximetry, bluish pigmentation of skin or bodily fluids, and skin necrosis²¹. Unwanted tattoos in the skin with the use of subdermal or intradermal injection technique due to the use of blue dyes are complications described in SLNB. This can be considered a cosmetic problem for women, especially if they persist for many months or years. Studies have shown that this condition persisted in 41% of patients for 1 year in the postoperative period¹⁹. The rate of skin pigmentation decreases more rapidly after the second year, but it may remain after three years^{21,22}.

The use of hemosiderin, confronting the literature data on non-allergic reactions to blue dyes, did not cause persistent pigmentation of the skin or bodily fluids, or interference with pulse oximetry, or cases of skin necrosis. In some cases, there is a persistence of small areas (ecchymosis and/or bruises) at the site of the subareolar injection, which become unnoticeable in a few days or weeks and disappear without leaving marks and/or permanent sequelae.

In the current scenario of breast cancer treatment, breast-conserving and oncoplastic surgeries, with the preservation of breast skin, gradually tend to substitute mastectomies and mutilating surgeries. The presence of tattoos and persistent pigmentations on the breasts due to the use of blue dyes add an anti-aesthetic component that hinder the result of minimally aggressive treatment efforts of modern surgery. Hemosiderin, as demonstrated in the present study, temporarily marks the breast skin with small areas of ecchymosis and/or bruises, allowing better aesthetic results without the unwanted persistent blue tattoos.

The postoperative monitoring of patients of up to 30 days after surgery allowed to evaluate the absence of signs and/or symptoms of surgical infection in the study patients as well as the results of cultures obtained from hemosiderin samples used in patients, which were negative, confirming the safety of the method and the absence of infectious complications.

In vitro studies indicate the genotoxicity of blue dyes and the increased level of oxidative DNA lesions. The methylene blue and patent blue, commonly used in SLNB, have genotoxic effects on breast cells in clinically relevant concentrations in vitro. In vivo studies are now needed to assess the damage to DNA caused by these dyes during SLNB. Although it is an in vitro study, these substances are not innocuous, as it has been thought²³. In contrast, hemosiderin, a dye without toxicity derived from the patient, minimizes these concerns.

With the present study, hemosiderin opens a new perspective to become an important tool in SLNB. Further studies with larger samples and consistent results are needed to confirm its

efficacy and safety. Therefore, it has the potential to substitute the current dyes and become the "gold standard" for SLNB.

Conclusion

Hemosiderin is an efficient and safe dye that is equivalent to ⁹⁹Tc in sentinel lymph node biopsy in breast cancer.

References

- Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977;39(2):456-66. PMID: 837331.
- Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol*. 1993;2(6):335-9, discussion 340. PMID: 8130940.
- Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994;220(3):391-8; discussion 398-401. PMID: 8092905.
- Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Robertson C, Maisonneuve P, Renne G, De Cicco C, De Lucia F, Gennari R. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(6):546-53. PMID: 12904519.
- Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, Benson AB, 3rd, Bosserman LD, Burstein HJ, Cody H, 3rd, Hayman J, Perkins CL, Podaloff DA, Giuliano AE. American Society of Clinical Oncology Clinical P. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1365-83. doi: 10.1200/JCO.2013.54.1177.
- Rutgers EJ. Guidelines to assure quality in breast cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(6):568-76. PMID: 16023942.
- Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de Velde CJ, Mansel RE, Bogaerts J, Duez N, Cataliotti I, Klinkenbijl JH, Westenberg HA, van der Mijle H, Snoij M, Hurkmans C, Rutgers EJ. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(7):1854-61. doi: 10.1245/s10434-010-0945-z.
- Thill M, Kurylcio A, Welter R, van Haasteren V, Grosse B, Berclaz G, Polkowski W, Hauser N. The Central-European SentiMag study: sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope. *Breast*. 2014;23(2):175-9. doi: 10.1016/j.breast.2014.01.004.
- Kalimo K, Jansen CT, Korman M. Sensitivity to Patent Blue dye during skin-prick testing and lymphography. A retrospective and prospective study. *Radiology*. 1981;141(2):365-7. doi: 10.1148/radiology.141.2.7291558.
- Mertes PM, Malinovsky JM, Mouton-Faivre C, Bonnet-Boyer MC, Benhajjoub A, Lavaud F, Valfrey J, O'Brien J, Pirat P, Lalourcey L, Demoly P. Anaphylaxis to dyes during the perioperative period: reports of 14 clinical cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(2):348-52. doi: 10.1016/j.jaci.2008.04.040.
- Haqque RA, Wagner A, Whisken JA, Nasser SM, Ewan PW. Anaphylaxis to patent blue V: a case series and proposed diagnostic protocol. *Allergy*. 2010;65(3):396-400. PMID: 19930233.
- Wohl S, Focke M, Hinterhuber G, Stingl G, Binder M. Near-fatal anaphylaxis to patent blue V. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):1037-8. doi: 10.1111/j.1365-2133.2004.05931.x.
- Salhab M, Al Sarakbi W, Mokbel K. Skin and fat necrosis of the breast following methylene blue dye injection for sentinel node biopsy in a patient with breast cancer. *Int Semin Surg Oncol*. 2005;2:26. doi: 10.1186/1477-7800-2-26.
- Scherer K, Studer W, Figueiredo V, Bircher AJ. Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96(3):497-500. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60921-0.
- Pinheiro LG, Oliveira Filho RS, Vasques PH, Filgueira PH, Aragao DH, Barbosa PM, Beserra HE, Cavalcante RV. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cir Bras*. 2009;24(6):432-6. PMID: 20011826.
- Sleth JC. [Anaphylaxis due to patent blue. Time to change dye?]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2008;27(6):515. doi: 10.1016/j.annfar.2008.05.004.
- Barthelmes L, Goyal A, Newcombe RG, McNeill F, Mansel RE, New S, groups As. Adverse reactions to patent blue V dye - The NEW START and ALMANAC experience. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36(4):399-403. doi: 10.1016/j.ejso.2009.10.007.
- Manson AL, Juneja R, Self R, Farquhar-Smith P, Macneil F, Seneviratne SL. Anaphylaxis to Patent Blue V: a case series. *Asia Pac Allergy*. 2012;2(1):86-9. doi: 10.5415/apallergy.2012.2.1.86.
- Lunitis S, Filippakis G, Sidhu V, Al Mufli R, Lee TH, Hadjiminis DJ. Atypical anaphylactic reaction to Patent Blue during sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Ann R Coll Surg Engl*. 2008;90(4):338-9. doi: 10.1308/003588408X285702.
- Ramin S, Azar FP, Malihe H. Methylene blue as the safest blue dye for sentinel node mapping - emphasis on anaphylaxis reaction. *Acta Oncol*. 2011;50(5):729-31. doi: 10.3109/0284186X.2011.562918.
- Govaert GA, Oostenbroek RJ, Plaisier PW. Prolonged skin staining after intradermal use of patent blue in sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(4):373-5. doi: 10.1016/j.ejso.2004.12.009.
- Gumus M, Gumus H, Jones SE, Jones PA, Sever AR, Weeks J. How long will I be blue? Prolonged skin staining following sentinel lymph node biopsy using intradermal patent blue dye. *Breast Care (Basel)*. 2013;8(3):199-202. doi: 10.1159/000352092.
- Masannat YA, Hanby A, Horgan K, Hardie LJ. DNA damaging effects of the dyes used in sentinel node biopsy: possible implications for clinical practice. *J Surg Res*. 2009;154(2):234-8. doi: 10.1016/j.jss.2008.07.039.

Correspondence:

Luiz Gonzaga Porto Pinheiro
Departamento de Cirurgia - Universidade Federal do Ceará (UFC)
Rua Professor Costa Mendes, 1608/ 3º andar
60430-140 Fortaleza - CE Brasil
Tel: (55 85)3366-8063
Fax: (55 85)3283-7851
luizgporto@uol.com.br

Received: July 10, 2015

Review: Sep 11, 2015

Accepted: Oct 13, 2015

Conflict of interest: none

Financial source: Banco do Nordeste do Brasil S.A.

[†]Research performed at Grupo de Educação e Estudos Oncológicos (GEEON), Extension of the Surgery Department, Universidade Federal do Ceará (UFC), Brazil.

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL “IDENTIFICAÇÃO DO LINFONODO SENTINELA UTILIZANDO HEMOSSIDERINA EM CASOS DE CÂNCER DE MAMA LOCALMENTE AVANÇADO”

DOI: 10.1590/S1806-09912017000613

Artigo Original

Identificação do linfonodo sentinela utilizando hemossiderina em casos de câncer de mama localmente avançado

Identification of the sentinel lymph node using hemosiderin in locally advanced breast cancer cases

PAULO HENRIQUE WALTER DE AGUIAR, ACBC-CE¹; RANNIERE GURGEL FURTADO DE AQUINO^{1,4}; MAYARA MAIA ALVES¹; JUIO MARCUS SOUSA CORREIA²; AYANÉ LAYNE DE SOUSA OLIVEIRA⁴; ANTÔNIO BRAZIL VIANA JÚNIOR³; LUIZ GONZAGA PORTO PINHEIRO, ECBC-CE¹.

RESUMO

Objetivo: verificar a taxa de concordância na identificação do linfonodo sentinela utilizando um marcador autólogo rico em hemossiderina e o Tecnécio 99 (Tc99) em casos de câncer de mama localmente avançados. **Métodos:** ensaio clínico fase 1, do tipo prospectivo, não randomizado, em 18 pacientes portadoras de câncer de mama com axila clinicamente negativa em estágio T2=4cm, T3 e T4. As pacientes foram submetidas à injeção subareolar de um marcador autólogo rico em hemossiderina 48 horas antes do procedimento cirúrgico para biópsia do linfonodo sentinela, e sua taxa de identificação foi comparada, no intraoperatório, com o marcador radioativo Tc99 (padrão-ouro). A concordância entre os métodos foi estabelecida pelo índice de Kappa. **Resultados:** a taxa de identificação do linfonodo sentinela foi de 88,9%, com uma média de dois linfonodos sentinelas por paciente. O estudo identificou os linfonodos sentinelas corados com hemossiderina em 83,3% dos casos (n=15), quando comparados com a taxa de identificação do Tc99, tendo sido observada concordância em 94,4% dos casos estudados. **Conclusão:** o marcador autólogo rico em hemossiderina se mostrou eficaz na identificação do linfonodo sentinela em casos de câncer de mama localmente avançado.

Descritores: Neoplasias da Mama; Biópsia de Linfonodo Sentinela; Hemossiderina; Tecnécio.

INTRODUÇÃO

O linfonodo sentinela (LS) consiste no primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática de um determinado sítio de tumor primário¹. Cabanas¹, em 1977, em seus estudos utilizando casos de adenocarcinoma de pênis estabeleceu pela primeira vez uma técnica para realizar biópsia do linfonodo sentinela (BLS). Com o objetivo de aprimorar a taxa de identificação do LS em casos de melanoma, Krag et al.², em 1993, utilizou o Tecnécio 99 (Tc99) com sucesso. Posteriormente, em 1994, Giuliano et al.³ usando azul patente como marcador de LS para o câncer de mama, introduziu o conceito de BLS na prática clínica. Em 2003, Veronesi et al.⁴, estabeleceram que a BLS era um método seguro e acurado para avaliar metástases axilares em mulheres com tumores de mamas pequenos. Atualmente, a BLS substituiu o esvaziamento axilar no estadiamento do câncer de mama inicial, com axila clinicamente negativa⁵.

A associação do Tc99 em combinação com o corante azul mostrou-se mais acurada para identificação do BLS^{2,3}. Outros corantes podem ser utilizados na iden-

tificação do LS durante o procedimento cirúrgico, como o azul de metileno, o azul patente e o isosulfan⁶. Entretanto, tais substâncias, em revisão recente da literatura, revelaram um expressivo número de reações de hipersensibilidade⁶⁻¹⁰. O azul patente pode causar desde efeitos adversos sutis, como rash cutâneo, até reações severas de anafilaxia^{11,12}. O azul de metileno também pode causar sérias reações, incluindo necrose de pele e gordura no local da injeção¹³. Reações anafiláticas com o isosulfan e azul patente em pacientes submetidas à BLS variam de 0,6% a 2,7%¹⁴.

Em 2009, Pinheiro et al.¹⁵ comprovou em pesquisa experimental em animais, a eficácia da hemossiderina, um produto da degradação da hemoglobina, proteína frequentemente encontrada nos lisossomos de histiócitos e de células de Kupfer, como corante autólogo na BLS em mama de cadelas. Nesse estudo, a associação de hemossiderina e Tc99, apresentou resultados semelhantes na BLS quando comparados ao Tc99 e azul patente. A hemossiderina apresentou-se, experimentalmente, como um novo corante, isento de efeitos adversos e uma alternativa aos corantes atuais.

1 - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, CE, Brasil. 2 - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Fortaleza, CE, Brasil. 3 - SONIMAGEM, Diagnóstico por imagem, Fortaleza, CE, Brasil. 4 - Universidade de Fortaleza, Faculdade de Medicina, Fortaleza, CE, Brasil. 5 - Universidade Federal do Ceará, Hospital Universitário Walter Cantídio, Fortaleza, CE, Brasil.

Em 2015, Vasques et al.¹⁵, introduziu os estudos da hemossiderina em casos de câncer de mama em humanos em tumores iniciais (T1/T2) com axila clinicamente negativa e obteve sucesso, com uma taxa de identificação e de concordância de 100% quando comparada ao padrão-ouro, o Tc99. Diante disso, por ter sido estudada apenas em tumores iniciais, a proposta desse trabalho foi avaliar a eficácia da utilização da hemossiderina como marcador autólogo para a identificação do linfonodo sentinela em cânceres de mama em pacientes portadoras de tumores localmente avançados (T2>4cm/T3/T4), comparando com o teste padrão-ouro, o Tc99.

MÉTODOS

Ensaio clínico fase 1, do tipo prospectivo, não randomizado, tendo como objeto mulheres portadoras de câncer de mama localmente avançado. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) e Hospital Universitário Walter Cantídio, por um único cirurgião, no período de janeiro a dezembro de 2016. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, no 2.032.200. Cada paciente foi informada a cerca dos procedimentos e assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação da pesquisa.

Amostra e critérios de seleção

A amostra foi constituída por 18 mulheres, não randomizadas, selecionadas no Ambulatório de Mastologia da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), com indicação de BLS. Foram incluídas pacientes com idades entre 18 e 75 anos, portadoras de câncer de mama com diagnóstico anatomopatológico comprovado, em estádios II (maior ou igual a 4cm), III e IV e que apresentavam axila clinicamente negativa antes da quimioterapia neoadjuvante. Foram excluídas as pacientes portadoras de câncer de mama inflamatório, gestantes, aquelas que tinham recebido algum ciclo de quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante ou que realizaram cirurgia axilar e/ou biópsia incisional prévia, que pudesse comprometer a drenagem linfática da mama.

Uma semana antes do início do estudo, todas

as participantes foram submetidas à avaliação clínica e laboratorial pré-operatória estando as mesmas aptas à serem submetidas ao procedimento cirúrgico. O perfil do ferro também foi avaliado previamente por meio do hemograma completo, das dosagens de ferro sérico, ferritina sérica, saturação de transferrina e capacidade total de ligação do ferro.

Preparação do marcador rico em hemossiderina

O preparo da hemossiderina para utilização no estudo foi obtida a partir de uma amostra de 16ml de sangue periférico, 48 horas antes da cirurgia. O sangue coletado era acondicionado em dois tubos BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado, de forma asséptica. Em seguida, era centrifugado a 2000rpm, a 22°C, por dez minutos. O material centrifugado se distribuiu em três camadas no tubo de ensaio. As camadas superior e intermediária (soro) eram descartadas, e a camada inferior (hemácias) diluída com soro fisiológico em igual volume ao retirado, e homogeneizado manualmente em câmara protegida por fluxo laminar. A solução obtida era novamente centrifugada (3800rpm por três minutos), com o aparecimento de duas fases. A primeira era descartada e o volume retirado repostado com água bidestilada, na câmara de fluxo laminar, provocando a hemólise do concentrado de hemácias. Após a terceira e última centrifugação (3800rpm por três minutos), obteve-se uma única fase de hemácias lisadas, um produto rico em hemossiderina em suspensão no líquido avermelhado. A garantia da esterilidade foi controlada com hemoculturas para bactérias e fungos.

Um volume de 4ml do corante rico em hemossiderina era injetado ambulatoriamente, com a paciente em decúbito dorsal, sob anestesia local com xilocaína a 2%, sem adrenalina, na região periareolar externa da mama (no sentido de 3h), em punção única e sob técnica asséptica (Figuras 1A e 1B).

As pacientes foram internadas e avaliadas quanto a apresentação de efeitos colaterais por 24 horas. Antes do procedimento cirúrgico, cada paciente foi submetida à injeção intradérmica subareolar pré-operatória de 0,2ml de Tc99 e, em seguida, sob anestesia local e sedação, foram submetidas ao procedimento cirúrgico.

Procedimentos: biópsia do linfonodo sentinela (BLS)

As pacientes foram submetidas à BLS, com incisão na prega axilar guiada pelo gama-probe, dissecação por planos até a identificação de ponto de captação máxima do Tc99, identificando-se o linfonodo marcado e a sua coloração (Figuras 2A e 2B). Após a exérese do linfonodo, verificou-se em cada um a intensidade de detecção do Tc99 pelo gama-probe. Tais dados foram registrados em uma ficha de coleta de dados para fins de análise posterior. Todas as peças cirúrgicas foram encaminhadas para estudo anatomopatológico e imunoistoquímico. As pacientes foram acompanhadas durante todo o procedimento, desde a injeção da hemossiderina, até o pós-operatório e retorno com 15 e 30 dias após a cirurgia.



Figura 1. A) Injeção subareolar de hemossiderina; B) Local pós-injeção da hemossiderina (hematoma pós-injeção).



Figura 2. A) Identificação intraoperatória do linfonodo sentinela com o Gamma-Probe; B) Linfonodos sentinelas fortemente marcados com hemossiderina.

Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando o coeficiente de concordância de Kappa. Valores do P foram determinados usando teste exato de Fisher. Valores de P menores e iguais a 0,05 foram aceitos como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Dezoito pacientes se submeteram à BLS com a hemossiderina de acordo com o método descrito. A média de idade das pacientes foi de 48,2 anos e observou-se que o status pré-menopausal predominou em 63,7% da amostra. Quanto ao tipo histológico, todas as pacientes estudadas possuíam carcinoma invasor,

sendo 17 do tipo ductal. Os tumores de estadiamento T3 predominaram na amostra e 55% das participantes apresentaram axila positiva após estudo histopatológico (Tabela 1). Não foram evidenciados efeitos adversos e/ou reações alérgicas, infecção cirúrgica ou toxicidade nas pacientes que foram submetidas à BLS com hemossiderina neste estudo.

No intraoperatório, a marcação com o preparado rico em hemossiderina se mostrou nitidamente satisfatória para a identificação visual e consequente diferenciação do LS dos demais linfonodos da cadeia axilar (Figura 3).

Tabela 1. Perfil clínico das pacientes incluídas no estudo e perfil anatomicopatológico dos tumores analisados.

Características	Valor
Idade (média em anos)	48,2 (33-69 ± 11)
Status menopausal	
Pré-menopausa	n=12 (66,7%)
Pós-menopausa	7 (33,3%)
Grau de invasão	
Carcinoma invasor	18 (100%)
Carcinoma <i>in situ</i>	0 (0%)
Localização do tumor primário	
Quadrante superior externo	11(60,5%)
Quadrante superior interno	3 (16,5%)
Quadrante inferior externo	2 (11,1%)
Quadrante inferior interno	1 (5,5%)
Central	1 (5,5%)
Tamanho do tumor	
T2=4cm	
T3	1(5,4%)
14(77,8%)	
T4C	3 (16,6%)
Status linfonodal	
Linfonodo sentinela negativo	10 (55,5%)
Linfonodo sentinela positivo	8 (44,5%)
Subtipo Histológico	
Ductal	17 (94,5%)
Lobular	1 (5,5%)



Figura 3. A) LS macroscopicamente corado pelo preparado rico em hemossiderina ao lado de outro linfonodo da cadeia axilar não corado; B) Aspecto intraoperatório do LS fortemente corado.

A eficácia da BLS com hemossiderina foi comparada à técnica padrão-ouro que utiliza a marcação com o Tc99, tendo-se observado uma detecção satisfatória do LS corado com hemossiderina e Tc99. A taxa de identificação do LS foi de 88,9%, sendo encontrado uma média de dois LS por paciente. O estudo identificou os LS corados com hemossiderina em 83,3% dos casos (n=15) e, quando comparado com a taxa de identificação do Tc99, foi observada uma concordância em 94,4% dos casos estudados, com índice de Kappa =0,77 e p=0,001 (Figura 4).

DISCUSSÃO

Estudos na literatura médica nas mais diversas condições mostram concordância aceitável no que diz res-

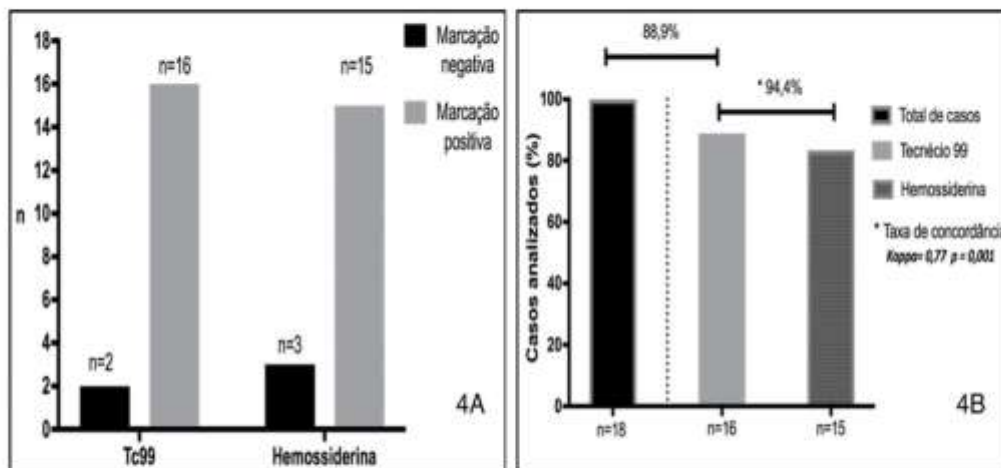


Figura 4. A) LS corados com hemossiderina e Tc99 por paciente; B) Taxa de concordância entre hemossiderina e Tc99 com significância estatística.

peito aos resultados encontrados no nosso trabalho. No estudo de Krag et al.², analisou-se 443 pacientes e a taxa de identificação foi de 93%. Albertini et al.¹⁷ associou as duas técnicas (azul patente e radiocoloide) e observou um aumento da taxa de identificação do LS, proporcionando taxa de identificação de 92% com valor preditivo de 100%. Já Veronesi et al.⁴ obtiveram taxa de identificação de 98,2% com falso negativo de 2,5%. Possíveis falhas na taxa de identificação podem ser justificadas por fatores inerentes à técnica, ao médico e ao paciente.

Quando se estuda pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante e em seguida submetidas à BLS, a taxa de identificação pode diminuir por fatores determinados pelos efeitos da quimioterapia. Estudo de Breslin et al.¹⁸ encontrou taxa de identificação de 84%. Outros ensaios proporcionaram taxas de identificação que variavam de 85 a 98%, como citado no trabalho de Xing et al.¹⁹. Jones et al.²⁰ compararam a biópsia do LS antes e depois da quimioterapia neoadjuvante encontrando taxa de identificação de 100% e 80,6%, respectivamente, e taxa de falso negativo elevada no grupo pós quimioterapia (11%). Na série estudada por Cox et al.²¹ de 89 pacientes com câncer de mama localmente avançado, estratificadas em dois grupos (axila positiva e axila negativa), evidenciou-se que a biópsia do LS pré-quimioterapia proporcionou acurácia adequada para axila negativa. Estudo de Papa et al.²² em que foram comparadas a biópsia do linfonodo sentinela pré e pós-quimioterapia, a taxa de identificação foi de 98,8% e 87%, respectivamente.

Outros marcadores para LS têm sido pesquisados e a nanopartícula férrica supermagnética resultou em taxa de identificação 77%, achados inferiores quando comparados com a utilização de hemossiderina como marcador autólogo em 14 pacientes submetidas à BLS; em que se obteve taxa de identificação de 100% com taxa de concordância de 100%¹⁶. Na nossa amostra, composta por 18 pacientes, houve identificação do LS em 16, quando utilizado o radiocoloide, e em 15 pacientes submetidas à técnica da hemossiderina, com uma taxa de concordância de 94,4% entre os dois métodos. A discrepância entre os dois métodos ocorreu em apenas uma paciente, em que se identificou o linfonodo pelo radiofármaco e não pela hemossiderina. Discute-se como causas prováveis, o tamanho da molécula de hemossiderina, uma vez que moléculas maiores podem não entrar nos ductos linfáticos, e a incapacidade de migração para o linfonodo estudado.

Existe uma tendência de se evitar o uso do radioisótopo e a exposição dos pacientes à radiação, assim como as complicações potencialmente graves do azul patente. Em unidades com departamentos de medicina nuclear estabelecidos, os custos são elevados, principalmente do gama-probe, e a meia-vida do radiofármaco é curta. O marcador autólogo estudado na amostra foi administrado com segurança 48 horas antes da cirurgia, sem efeitos adversos.

Nosso estudo sugere que seja viável a aplicabilidade clínica da hemossiderina como marcador autólogo na identificação do linfonodo sentinela em casos de câncer de mama localmente avançado.

ABSTRACT

Objective: to verify the agreement rate in the identification of sentinel lymph node using an autologous marker rich in hemosiderin and ⁹⁹Tc Technetium (Tc99) in patients with locally advanced breast cancer. **Methods:** clinical trial phase 1, prospective, non-randomized, of 18 patients with breast cancer and clinically negative axilla stages T2=4cm, T3 and T4. Patients were submitted to sub-areolar injection of hemosiderin 48 hours prior to sentinel biopsy surgery; and the identification rate was compared at intraoperative period to the gold standard marker Tc99. Agreement between methods was determined by Kappa index. **Results:** identification rate of sentinel lymph node was 88.9%, with a medium of two sentinel lymph nodes per patients. The study identified sentinel lymph nodes stained by hemosiderin in 83.3% patients (n=15), and, compared to Tc99 identification, the agreement rate was 94.4%. **Conclusion:** autologous marker rich in hemosiderin was effective to identify sentinel lymph nodes in locally advanced breast cancer patients.

Keywords: Breast Neoplasms. Sentinel Lymph Node Biopsy. Hemosiderin. Technetium.

REFERÊNCIAS

- Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977;39(2):456-66.
- Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol*. 1993;2(6):335-9; discussion 340.
- Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994;220(3):391-8; discussion 398-401.
- Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(6):546-53.
- Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, Benson AB 3rd, Bosserman LD, Burstein HJ, Cody H 3rd, Hayman J, Perkins CL, Podoloff DA, Giuliano AE; American Society of Clinical Oncology Clinical Practice. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1365-83.
- Rutgers EJ. Guidelines to assure quality in breast cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(6):568-76.
- Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de Velde CJ, Mansel RE, Bogaerts J, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(7):1854-61.
- Thill M, Kurylcio A, Welter R, van Haasteren V, Grosse B, Berdaz G, et al. The Central-European SentiMag study: sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope. *Breast*. 2014;23(2):175-9.
- Kalimo K, Jansén CT, Korman M. Sensitivity to Patent Blue dye during skin-prick testing and lymphography. A retrospective and prospective study. *Radiology*. 1981;141(2):365-7.
- Mertes PM, Malinovsky JM, Mouton-Faivre C, Bonnet-Boyer MC, Benhajjoub A, Lavaud F, et al. Anaphylaxis to dyes during the perioperative period: reports of 14 clinical cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(2):348-52.
- Haque RA, Wagner A, Whisken JA, Nasser SM, Ewan PW. Anaphylaxis to patent blue V: a case series and proposed diagnostic protocol. *Allergy*. 2010;65(3):396-400.
- Wöhrl S, Focke M, Hinterhuber G, Stingl G, Binder M. Near-fatal anaphylaxis to patent blue V. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):1037-8.
- Salhab M, Al Sarakbi W, Mokbel K. Skin and fat necrosis of the breast following methylene blue dye injection for sentinel node biopsy in a patient with breast cancer. *Int Semin Surg Oncol*. 2005;2:26.
- Scherer K, Studer W, Figueiredo V, Bircher AJ. Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96(3):497-500.
- Pinheiro LG, Oliveira Filho RS, Vasques PH, Filgueira PH, Aragão DH, Barbosa PM, et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cir Bras*. 2009;24(6):432-6.
- Vasques PH, Alves MM, Aquino RG, Torres RV, Bezerra JL, Brasileiro LP, et al. Comparison between hemosiderin and Technetium-99 in sentinel lymph

- node biopsy in human breast cancer. *Acta Cir Bras.* 2015;30(11):785-90.
17. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA.* 1996;276(22):1818-22.
 18. Breslin TM, Cohen L, Sahin A, Fleming JB, Kuerer HM, Newman LA, et al. Sentinel lymph node biopsy is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(20):3480-6.
 19. Xing Y, Cormier JN, Kuerer HM, Hunt KK. Sentinel lymph node biopsy following neoadjuvant chemotherapy: review of the literature and recommendations for use in patient management. *Asian J Surg.* 2004;27(4):262-7.
 20. Jones JL, Zabicki K, Christian RL, Gadd MA, Hughes KS, Lesnikoski BA, et al. A comparison of sentinel node biopsy before and after neoadjuvant chemotherapy: timing is important. *Am J Surg.* 2005;190(4):517-20.
 21. Cox CE, Cox JM, White LB, Stowell NG, Clark JD, Allred N, et al. Sentinel node biopsy before neoadjuvant chemotherapy for determining axillary status and treatment prognosis in locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(4):483-90.
 22. Papa MZ, Zippel D, Kaufman B, Shimon-Paluch S, Yosepovich A, Oberman B, et al. Timing of sentinel lymph node biopsy in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Surg Oncol.* 2008;98(6):403-6.

Recebido em: 16/08/2017

Aceito para publicação em: 17/09/2017

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Luiz Gonzaga Porto Pinheiro

E-mail: luizgporto@uol.com.br

APÊNDICE C – ORIGINAL ARTICLE “ASEPTIC AND OPTIMIZED PREPARATION OF HUMAN BLOOD DERIVED FOR LYMPH NODE IDENTIFICATION IN WOMAN BREAST: TRANSOPERATORY CONTROL WITH TECHNETIUM

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



Aseptic and Optimized Preparation of Human Blood Derived for Lymph Node Identification in woman breast: transoperatory control with technetium

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Alves, Mayara; Universidade Federal do Ceará, Biochemistry and Molecular Biology Rocha, Bruno Anderson; Universidade Federal do Ceará, Biochemistry and Molecular Biology Pinheiro, Agostinho ; Universidade Federal do Ceará, Surgery Silva, Dayara; Universidade Federal do Ceará, Biochemistry and Molecular Biology Bezerra, José Lucas ; Universidade Federal do Ceará, Surgery Vasques, Paulo Henrique; Universidade Federal do Ceará, Surgery Ferreira, Márcia; Universidade Federal do Ceará, Pathology and Forensic Medicine Pinheiro, Luiz Gonzaga; Universidade Federal do Ceará, Surgery
Keyword:	sentinel lymph node, breast cancer, blood cells
Theme:	Therapy, Pathology, Diagnostics

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

*Aseptic and Optimized Preparation of Human Blood Derived for
Lymph Node Identification in woman breast: transoperatory control
with technetium.*

**Mayara Maia Alves¹; Bruno Anderson Matias da Rocha^{1,2*}; Agostinho
Câmara Pinheiro³; Dayara de Oliveira Silva²; José Lucas Martins
Bezerra³; Paulo Henrique Diógenes Vasques³; Marcia Pitombeira⁴;
Luiz Gonzaga Porto Pinheiro⁶**

1 Programa de Pós-graduação de Biotecnologia, UFC, Fortaleza - CE,
Brazil.

2 Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza -
CE, Brazil

3 Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, UFC, Fortaleza -
CE, Brazil

4 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UFC, Fortaleza-
CE, Brazil

***Correspondence to: Bruno A.M. Rocha Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará,**

1
2
3
4 **LABIC, Campus do Pici S/N, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-**
5 **mail brunoanderson@gmail.com**
6

7
8 **ABSTRACT**
9

10
11 **BACKGROUND:** In the breast cancer treatment, characteristics of
12
13 primary tumor and axillary status are important prognostic factors. The
14
15 recognition that axillary metastasis initiates in the first lymph node
16
17 (sentinel) has changed the surgery management. Currently, there are
18
19 few available markers for identification of sentinel lymph node (SLN) in
20
21 the surgical procedure. **OBJECTIVES:** The prospect of a possible
22
23 replacement of markers currently used arises with the discovery of a
24
25 new SLN blood-derived marker aiming a safe, efficient and low-cost,
26
27 optimized technique of preparation of this tissue marker to increased
28
29 tissue marking and reducing the risk of contamination in preparation.
30
31 **METHODS:** Thirty samples were used in volunteer donors: 20 patients
32
33 granted whole blood for analysis of blood-derived collection and handling
34
35 sterilely and 10 patients performed the procedure of Sentinel lymph
36
37 node biopsy using the optimized marker. **FINDINGS:** The results of the
38
39 microbiological quality control of the samples after collection and
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

handling of blood derived were satisfactory, having no presence of contaminants. The rate of SLN identification was 100% with no evidence of side effects or allergic reactions. MAIN CONCLUSIONS: After the results, became evident the optimization of blood derived preparation and tissue marking showed by SLN.

Keywords: sentinel lymph node, breast cancer, blood cells

INTRODUÇÃO

The axillary status is the most important prognostic factor in breast tumors. The conventional surgical treatment in patients with compromised axillae is the dissection of the axillary lymph nodes (axillary dissection) aiming staging and therapy. The Sentinel lymph node biopsy has become routine protocol in recent years, being an important method of staging and replacement for the axillary dissection in treatment of early breast cancers T1 and T2 (≤ 3 cm) based on the identification and removal of SLN for analysis. The pathological examination can reveal the absence of metastasis in the SLN leading to consider that the remaining lymph nodes located distally were not

1
2
3
4 compromised. However, the presence of metastases in the SLN is an
5
6
7 axillary dissection indicative and more advanced disease prognostic
8
9
10 (SHWARTZ *et al.*, 2001; MATTES *et al.*, 2015; QUADROS e GEBRIM,
11
12
13 2007; PAZ *et al.*, 2001).

14
15
16
17 Currently, there are three main techniques for identification of
18
19
20 SLN: dye injection, injection of radioactive substance or association of
21
22
23 two techniques (EAST *et al.*, 2009; MANSEL; GOYAL, 2004). The
24
25
26 results of the research with lymph nodes sentinels are promising;
27
28
29 however the use of markers has drawbacks, as an example, the high
30
31
32 cost of technetium and allergic reactions caused by patent blue. In this
33
34
35 context, the practice of markers in the realization of the SLN biopsy is
36
37
38 the focus of many studies and innovations (PINHEIRO *et al.*, 2009;
39
40
41 AGUIAR *et al.*, 2017; VASQUES *et al.*, 2015).

42
43
44
45
46
47 The research conducted by Pinheiro and collaborators (2009) is a
48
49
50 highlight in view of the current innovations of SLN markers. After
51
52
53 performing breast biopsy procedures in two patients with sickle cell trait,
54
55
56 it was observed, in the post-operative clinical examination, the mapping
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

of Lymphatic vessels with a reddish coloration in the breast towards the axillary lymph node, suggesting that a blood derived later identified, as Hemosiderin could be responsible. Vasques et al. (2015) and Aguiar et al. (2017) evaluated the safety and potential equivalence of the use of hemosiderin in the SLN biopsy in patients with initial breast cancer and advanced, respectively. Similar results were obtained in the detection of SLN stained with hemosiderin and Tc99 when compared with SLN stained with patent blue and Tc99.

Aiming to optimize the preparation and possible tissue marking with the hemosiderin, the goal of this work was to identify the critical points of the methodologies employed by the aforementioned authors and to standardize the technique from the collection of total blood to the surgical procedure.

MATERIALS AND METHODS

Prospective, non-randomized Clinical Analysis Phase 1 applied in patients with initial breast cancer (initial tumors (T1/T2) and clinically negative axilla) and advanced (stages II ($T \geq 4$ cm), III and IV) with

1
2
3
4 clinically negative axilla. The surgical procedures were performed at the
5
6
7 Maternity School Assis Chateaubriand and Hospital Walter Cantídio, in
8
9
10 the period from 2011 to 2016. The Research Ethics Committee of the
11
12
13 Walter Cantídio University Hospital of the Federal University of Ceará
14
15
16 approved the study, in 0730710 and 2032200. The patients were
17
18
19 informed about the procedures and signed a free and informed consent
20
21
22 form to participate in the study. One week before the surgical
23
24
25 procedure, each participant was submitted to a preoperative clinical and
26
27
28 laboratorial evaluation, being the same, therefore, able to undergo
29
30
31 surgery.
32
33
34
35
36
37

38 **1. Optimized Hemosiderin Marker Preparation**

39 40 41 **Total Blood Collection**

42
43
44
45
46 According to the procedure already performed by the Ceara State
47
48
49 Hemocenter (Hemoce), the collection was performed by trained
50
51
52 professionals, under strict conditions of antisepsis, to minimize the
53
54
55 contamination of the unit collects and by careful technique to avoid local
56
57
58 complications such as bruising and nervous injury. A vein was selected
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

that provided good blood flow, performing antiseptics of the collection site and collecting by puncture in an average time of 5 minutes.

The collection was carried out in a closed circuit with the aid of Vacutainer® scalp (Becton, Dickinson and Company), first connected to the Vacutainer®, for removal of the skin fragment, and immediately after, it connects Vacutainer® with ACD (citrate phosphate, Dextrose and adenine) consecutively for total blood sample withdrawal.

Hemosiderin marker preparation

In order to evaluate the best centrifugation time for total blood samples collected, the tubes containing total blood were centrifuged four times in the same rotation and temperature conditions (3500 rpm to 4°C) and varying times (5, 10, 15 and 20 min). Then, the entire supernatant was discarded, collecting only one sample of the red blood cells (CH) of each tube for later analysis.

Finally, after choosing the best centrifugation time, we analyzed the volume of water required for hemolysis of erythrocytes contained in

1
2
3
4 8 ml of total blood, adding 0.5 ml; 1 ml and 2 ml of bidistilled water to
5
6
7 red blood cells concentrated in quadruplicate and homogenizing
8
9
10 manually.
11
12
13

14 **Standardization of hemosiderin marker preparation**

15
16
17

18 Approximately 5ml of each sample were removed for the smears
19
20 (Hematoxylin-eosin staining) and tests number of residual leukocytes,
21
22 total hemoglobin and degree of hemolysis with the intent to evaluate the
23
24 efficacy of leukoreduction, hemolysis process and, consequently, the
25
26 efficiency of the technique used.
27
28
29
30
31
32
33
34

35 The determination of hematocrit, total hemoglobin, free hemoglobin
36
37 and residual leukocytes were performed using the CELL-DYN Ruby
38
39 apparatus - manufactured by Abbott Laboratories ®.
40
41
42
43
44

45 The hemolysis determination of red blood cells (CRW) was
46
47 performed applying a mathematical formula employing the hematocrit of
48
49 CH, extracellular hemoglobin of CHL and total hemoglobin of CH
50
51
52 (Sakuma, Ottoboni and SIERRA, 2011):
53
54
55

56
57
58 % hemolysis = $100 - (Ht \times Hbe) \div Hb$
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

where:

Ht = Hematocrit (%)

Hbe = Hemoglobin extracelular (g/dl)

Hb = Hemoglobin total (g/dl) The acceptable parameters after obtaining the concentrate of washed and hemolysed red blood cells are described in table 4.

2. Standardization of hemosiderin marker aseptic manipulation

In order to evaluate the standardization of the aseptic manipulation method, 50 aliquots of the hemolyzed erythrocytes concentrate were evaluated after the entire process, from the collection to the production of the Hemosiderin marker.

For the opening of the Vacutainer® tube containing the total blood centrifuged, we used a class 2a biological safety cabin, thus avoiding contamination by microorganisms. Always paying attention to a satisfactory asepsis, the flow was sanitized with oxygenated water, alcohol 70 °C and germicidal light 30 minutes before being used.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The non-biological material used in the procedure of obtaining autologous tissue marker of the blood was first disinfected with alcohol 70 °C and then suffered the action of germicidal light for 30 minutes.

After sample centrifugation and material disinfestation, the manipulation of the blood derivative was initiated. First, the supernatants were removed with the aid of a syringe, and the bidistilled water was added and lightly homogenized. Finally, aliquots of each tube were withdrawn to evaluate the presence of contaminants in the process of preparation of the hemoderivative.

Microbiological quality Control

After the homogenization of the tubes, aliquots of each tube were removed and applied, according to the appropriate specifications, in the means for blood cultures of aerobic microorganisms and fungi or mycobacteria. Finally, the blood cultures were maintained in BD Bactec™ FX, in an environment favorable to the development of microorganisms.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The isolation of cultures and microscopy would be performed after select positive samples, and subsequently, their identification through standardized biochemical tests (LEVY et al., 2004).

Administration of hemosiderin marker

In an outpatient setting, patients in dorsal decubitus, under local anesthesia with 2% xylocaine, without adrenaline, were submitted to the injection procedure of the hemosiderin marker in the external periareolar region of the breast (3h), in single puncture and under aseptic technique. Two ml were injected (drained for 24 h until the surgical procedure) and 4 ml (drained by 48 h until the surgical procedure) of the hemosiderin marker in patients with early and advanced breast cancer, respectively (Figure 1A).

Sentinel lymph node identification

1
2
3
4 After administration of the hemosiderin marker, the patients were
5
6
7 hospitalized and evaluated for the presentation of side effects for 24 h.
8
9
10 Before the surgical procedure, the patients were submitted to
11
12
13 preoperative subareolar intradermal injection of 0.2 ml of Tc99 and then
14
15
16 under local anesthesia and sedation were submitted to the surgical
17
18
19 procedure.
20
21
22
23

24 Sentinel lymph node biopsy was performed in the patients, with
25
26
27 the incision in the axillary fold guided by Gamma-Probe, dissecting by
28
29
30 planes until the identification of the maximum uptake point of the Tc99,
31
32
33 identifying the marked lymph nodes and their coloration (Figures 1B and
34
35
36 1C). Data were recorded in a data collection form for later analysis
37
38
39 purposes. All surgical specimens were referred for anatomopathological
40
41
42 and immunohistochemical study. The patients were submitted to clinical
43
44
45 evaluation throughout the procedure, from the injection of hemosiderin,
46
47
48 until the postoperative period, returning with 7, 15 and 30 days after
49
50
51 surgery.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

Preparation of the optimized hemosiderin marker

After centrifugations at different times (5, 10, 15 and 20 minutes) in the preparation of the marker, a more effective separation of the contaminants (leukocyte cells and platelets) from the CH was observed in parallel with the increase in the centrifugation time (Figure 2). The achievement of Hemosiderin marker showed satisfactory qualitative data, through which the micrographs showed a significant decrease in the number of residual leukocytes with 20 minutes of Centrifugation (3500 rpm to 4°C) (Figure 2D) and entire erythrocytes after hemolysis with 2 ml of bidistilled water (Figure 3C). This efficiency in centrifugation was well represented by micrography (Figure 2D), which presented a better deleukocytization and confirmed quantitatively, through the low number of residual leukocytes, according to the acceptable parameters of obtaining of the erythrocytes concentrate (Table 1).

1
2
3
4 Therefore, showing the count of residual leukocytes smaller than
5
6
7 $5.0 \times 10^6/\text{unit}$. The total hemoglobin concentration was greater than 40
8
9
10 g/unit. The degree of hemolysis greater than 80% suggests that there
11
12
13 was efficiency in hemolysis by hypotonic (bidistilled water), capable of
14
15
16 causing drastic hemolysis in the concentrate of red blood cells studied,
17
18
19 because it is not observed the presence of intact cell, only residues of
20
21
22 cell membrane on optical microscopy (Figure 3).
23
24
25
26

27
28 The hemolysis process was followed by micrography and by the
29
30
31 determination of the degree of hemolysis. It is possible to observe
32
33
34 erythrocytes with more definite cell membrane when compared with
35
36
37 erythrocytes group after hemolysis (Figure 3) and decrease and/or
38
39
40 absence of apparently intact cells, because the increase in the volume
41
42
43 of bidistilled water was proportional to the increase in the degree of
44
45
46 hemolysis, according to the acceptable parameters of obtaining the total
47
48
49 extract (Table 1).
50
51
52
53
54

55 **Standardization of aseptic manipulation of hemosiderin marker**

56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

After standardization of the Hemosiderin marker preparation, it was evaluated the possibility of contamination due to changes in the process of obtaining the marker. For this, blood cultures were performed for aerobic microorganisms and fungi or mycobacteria. Finally, after the standardization of aseptic manipulation from the collection to the preparation of the Hemosiderin marker (Figure 4), there was no trace of contamination in the 50 samples of hemosiderin dye.

Sentinel lymph node identification

The efficacy of the BLS with the Hemosiderin marker was tested through the equivalence of hemosiderin compared to the technique using the TC 99 marking, where a similar detection of the LS stained with Hemosiderin and TC 99 was observed in all patients (Figure 5). The identification rate of the LS was 100% in patients in whom 2 ml of the marker were administered and submitted to the surgical procedure after 24 h (Figure 2A). However, the patients in which 4 mL of the Hemosiderin marker were administered and submitted to the surgical

1
2
3
4 procedure after 48 h obtained better tissue markings of the SLN (Figure
5
6
7 3B),
8
9

10 11 **DISCUSSION**

12
13
14
15 Considering that methodologies for the preparation of the
16
17
18 hemosiderin marker cited by Pinheiro et al (2009); Vasques (2015) and
19
20
21 Aguiar et al (2017), presented relevant critical points that deserved
22
23
24 attention, we tried to eliminate or minimize them with the standardization
25
26
27 of the method from the collection to the administration of the marker,
28
29
30 aiming to optimize the tissue marking and decrease the contamination
31
32
33 risks.
34
35
36
37
38

39 The quantitative indicators after obtaining the concentrates of
40
41
42 washed and hemolyzed red blood cells are within the acceptance
43
44
45 criteria to control the quality recommended by the Service network
46
47
48 Technological for Blood and Derivatives (Chart 1) (Sakuma, Ottoboni
49
50
51 and SIERRA, 2011).
52
53
54
55

56 After a standardization and optimization of the aseptic production
57
58
59 process of the marker to obtain a larger number of marked lymph
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

nodes, as well as the study by Vasques et al (2015) and Aguiar et al (2017), our research demonstrates the clinical applicability of the hemosiderin marker in early and advanced cancer, and the identification rate of SLN was observed in 100% of the patients studied. The procedure indicates for better tissue markings of SLN is the administration of 4 ml of the Hemosiderin marker in patients who will be submitted to the surgical procedure after 48 h.

Theoretically, the hemosiderin marker can be compared to the Tc99, gold standard in BLS, since it demonstrated a high rate of identification between the methods. Some other innovations could be addressed in this perspective, such as substances that are recently being used in clinical practice as superparamagnetic iron and new LS dyes, facilitating their identification in the surgical act (GHILLI et al., 2015). Although, this research opens perspectives for further studies, where the new and low cost tissue marker with no adverse effects increases the possibility of use in the prognosis of breast cancer.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGMENT

This study was partly funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). BAMR is senior investigator of CNPq.

AUTHOR CONTRIBUTION

Mayara Maia Alves - Optimization of hemosiderin marker preparation and manuscript writing; Bruno Anderson Matias da Rocha - Experimental design and manuscript writing; Agostinho Câmara Pinheiro - Blood preparation and analysis; Dayara de Oliveira Silva - Blood preparation analysis; Paulo Henrique Diógenes Vasques - Administration of hemosiderin marker; Marcia Pitombeira - Histology and pathology; and Luiz Gonzaga Porto Pinheiro - Sentinel lymph node identification

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Paulo Henrique Walter de; ACBC-CE1; AQUINO, Ranniere Gurgel Furtado de; ALVES, Mayara Maia; CORREIA, Julio Marcus Sousa; OLIVEIRA, Ayane Layne de Sousa; VIANA JÚNIOR, Antônio Brazil; PINHEIRO, Luiz Gonzaga Porto, ECBC-CE1. **Rev Col Bras Cir** 2017; 44(6): 612-618
- EAST, J. M. Et al. Sentinel lymph node biopsy for breast câncer using methylene blue dye manifests a short learning curve among experience surgeons: a prospective tabular cumulative sum (CUSUM) analysis. **BMC surgery**, v.9, n.1, p.2, 2009.
- GHILLI, M. et al. The superparamagnetic iron oxide tracer: a valid alternative in sentinela node biopsy for breast câncer treatment. **European Journal of Cancer Care**, 2015.
- LEVY, Carlos Emilio *et al.* Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

1
2
3
4 MANSEL, R. E.; GOYAL, A. European studies on breast lymphatic
5
6 mapping. **Seminars in oncology**, 2004. Elsevier. p.304-310.
7

8
9
10 MATTES, Malcolm D; BHATIA, Jay K; METZGER, Daniel; ASHAMALLA,
11
12 Hani; KATSOULAKIS, Evangelia. Breast Cancer Subtype as a Predictor
13
14 of Lymph Node Metastasis according to the SEER Registry. **J Breast**
15
16 **Cancer**. 2015 Jun; 18(2): 143-148. Published online 2015 Jun 26.
17
18
19

20
21
22
23 PAZ, W. A.; PAIM, S. P.; MELLO, G. L.; RANGEL, K. K.; CHRISTO, R.
24
25 C.; GONÇALVES, R.; SILVA M. E.; BARROSO, A. A.; SOUZA, A. F.
26
27 Sentinel Lymph Node Biopsy - Clinical Experience. **Revista Brasileira**
28
29 **de Cancerologia**, 2001, 47(3): 303-08.
30
31
32

33
34
35
36 PINHEIRO, L. G. *et al.* Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph
37
38 node identification. **Acta Cir Bras**, v. 24, n. 6, p. 432- 6, Nov-Dec 2009.
39
40
41

42
43
44 QUADROS, L. G. A.; GEBRIM, L. H.The sentinel lymph node biopsy in
45
46 breast cancer in the practice of the Brazilian gynecologist: a revisio.
47
48 **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2007; 29(3):158.
49
50

51
52
53 SAKUMA, Alice; OTTOBONI, Maria Ângela Pignata; SIERRA, Patrícia
54
55 Cressoni. Rede de Serviços Tecnológicos para Sangue e
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hemoderivados. **Manual para controle da qualidade do sangue total e hemocomponentes.** São Paulo: RedSang-SIBRATEC, 2011.

SHWARTZ, G. F.; GIULIANO, A. E.; VERONESI, U. *et al.* Proceedings of the Consensus Conference on the Role of Sentinel Lymph Node Biopsy in Carcinoma of the Breast. April 19-22, 2001, Philadelphia, PA, USA. **The Breast Journal** 2002;8 -126-138.

VASQUES PH, ALVES MM, AQUINO RG, TORRES RV, BEZERRA JL, BRASILEIRO LP, *et al.* Comparison between hemosiderin and Technetium -99 in sentinel lymph node in human breast cancer. **Acta Cir. Bras.** 2015; 30 (11); 785-90.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLE

Table 1. Acceptable parameters of concentration of washed and hemolyzed red blood cells

Analysis	Expected values
Total hemoglobina	> 40 g/unid.
Degree hemolyses	> 80% of red blood cells mass
Residual leukocytes	< 5,0 x 10 ⁶ /unid.

Adapted from SAKUMA, OTTOBONI e SIERRA, 2011.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Procedures: (A) Administration of the Hemosiderin marker. (B) Identification of sentinel lymph node with Gamma-Probre, guided by radiopharmaceutical Tc99 (C) sentinel lymph nodes marked with Hemosiderin.

Figure 2. Micrographs (Increase 100 x) to evaluate the time of effective centrifugation for leucorredution. The tubes containing total blood were centrifuged four times, in the same conditions of rotation and temperature (3500 rpm at 4 °C), at different times: 5 min (a), 10 min (B), 15 min (C) and 20 min (D).

Figure 3. Micrographs (Increase 100 x) to evaluate the volume of hemolysing required to increase the hemolysis degree of erythrocytes. After adding 0.5 ML (A); 1 ml (B) and 2 ml (C) of bidistilled water to red blood cells and homogenizing manually.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 4. Flowchart of the aseptic manipulation of total blood for the production of the sentinel lymph node Hemosiderin. A: Collection in the closed circuit. B: centrifugation 3500 rpm at 4 °C for 20 min. C: Withdrawal of the supernatant. D: hemolysis with 2 ml of bidistilled water. E: Microbiological Control

Figure 5. Tissue marking of SLN staining: control (-) lymph node without hemosiderin marker. (A) lymph nodes stained with 2 ML of the Hemosiderin dye after 24 h of drainage until the surgical procedure. (B) lymph nodes stained with 4 ML of the Hemosiderin dye after 48 h of drainage until the surgical procedure.

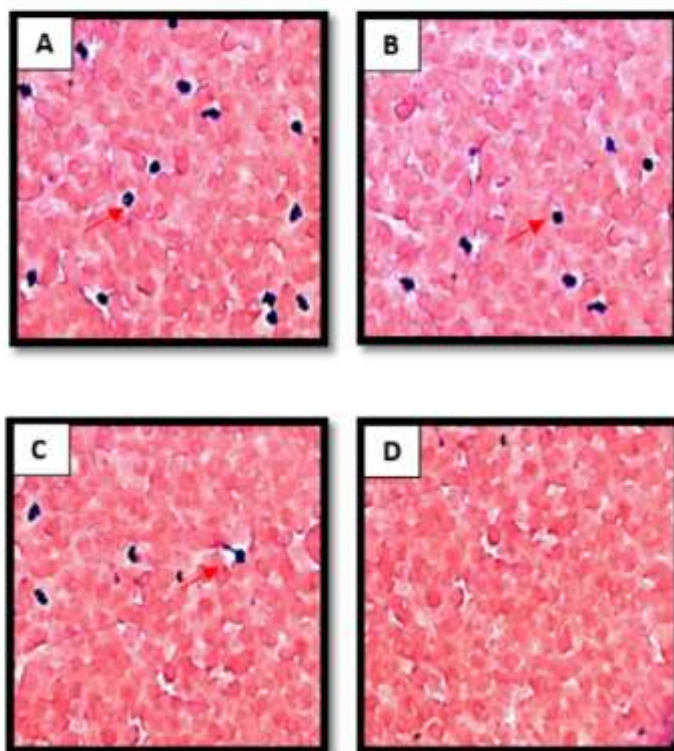
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Procedures: (A) Administration of the Hemosiderin marker. (B) Identification of sentinel lymph node with Gamma-Probre, guided by radiopharmaceutical Tc99 (C) sentinel lymph nodes marked with Hemosiderin.

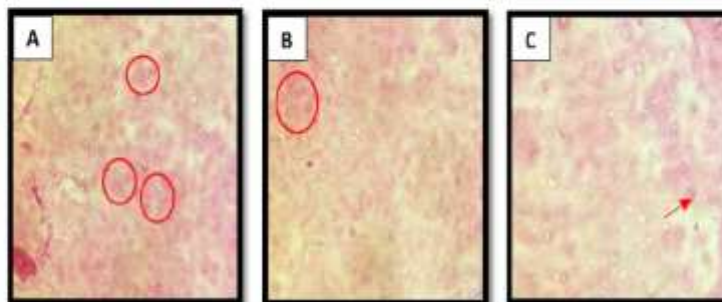
200x98mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Micrographs (Increase 100 x) to evaluate the time of effective centrifugation for leucocytosis. The tubes containing total blood were centrifuged four times, in the same conditions of rotation and temperature (3500 rpm at 4 °C), at different times: 5 min (a), 10 min (B), 15 min (C) and 20 min (D).

118x124mm (150 x 150 DPI)



Micrographs (Increase 100 x) to evaluate the volume of hemolysing required to increase the hemolysis degree of erythrocytes. After adding 0.5 ML (A); 1 ml (B) and 2 ml (C) of bidistilled water to red blood cells and homogenizing manually.

183x80mm (150 x 150 DPI)

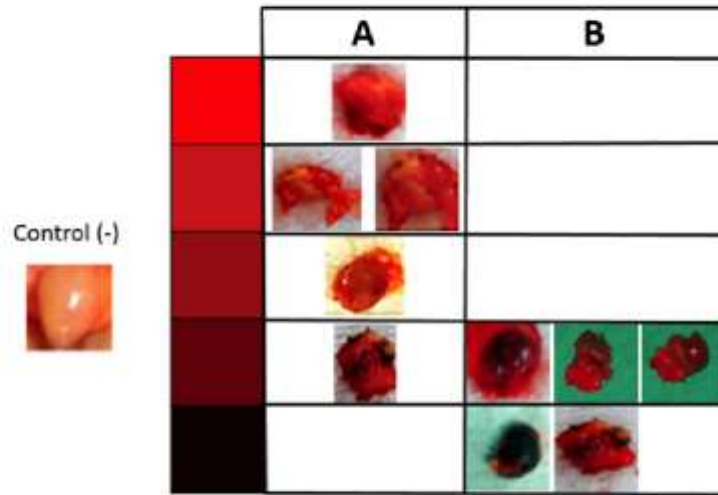
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Flowchart of the aseptic manipulation of total blood for the production of the sentinel lymph node Hemosiderin. A: Collection in the closed circuit. B: centrifugation 3500 rpm at 4 °C for 20 min. C: Withdrawal of the supernatant. D: hemolysis with 2 ml of bidistilled water. E: Microbiological Control

145x30mm (150 x 150 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Tissue marking of SLN staining: control (-) lymph node without hemosiderin marker. (A) lymph nodes stained with 2 ML of the Hemosiderin dye after 24 h of drainage until the surgical procedure. (B) lymph nodes stained with 4 ML of the Hemosiderin dye after 48 h of drainage until the surgical procedure.

144x102mm (150 x 150 DPI)

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

ScholarOne Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
[" Home](#)
[# Author](#)
[\\$ Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Manuscript ID MIOC-2018-0591

Title Aseptic and Optimized Preparation of Human Blood Derived for Lymph Node Identification in woman breast: transoperatory control with technetium

Authors Alves, Mayara
 Rocha, Bruno Anderson
 Pinheiro, Agostinho
 Silva, Dayara
 Bezerra, José Lucas
 Vasques, Paulo Henrique
 Ferreira, Márcia
 Pinheiro, Luiz Gonzaga

Date Submitted 17-Dec-2018

[Author Dashboard](#)

APÊNDICE D – ARTIGO ORIGINAL “BLOOD-DERIVED MARKER FOR BREAST CANCER SENTINEL LYMPH NODE IDENTIFICATION: A HISTOPATHOLOGIC AND BIOCHEMICAL STUDY IN RATS”

Breast Cancer Research and Treatment

Blood-derived marker for breast cancer sentinel lymph node identification: a histopathologic and biochemical study in rats.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BREA-D-20-01139
Full Title:	Blood-derived marker for breast cancer sentinel lymph node identification: a histopathologic and biochemical study in rats.
Article Type:	Preclinical study
Keywords:	lymph nodes, breast cancer, blood cells, hemoglobin, methemoglobin, tissue marker
Corresponding Author:	Mayara MAIA Alves, PhD Universidade Federal do Ceara - Campus do Pici Fortaleza, Ce BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Ceara - Campus do Pici
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Mayara Maia Alves, PhD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Mayara Maia Alves, PhD Agostinho Câmara Pinheiro, Undergraduate Dayara de Oliveira Silva, Undergraduate José Lucas Martins Bezerra, Undergraduate Danilo Damasceno Rocha, PHD Eduardo Salviano Bezerra, PHD Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, PHD Luiz Gonzaga Porto Pinheiro, PHD Bruno Anderson Matias da Rocha, PHD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Purpose Sentinel lymph node (SLN) biopsy in the surgical treatment of early stage breast cancer is currently employed as part of the routine protocol. Recent studies have shown the use hemosiderin, a new marker derived from the patient's own blood, capable of facilitating the surgical procedure. However, the hypothesis that the blood-derived marker would be hemosiderin arose only from clinical data and preliminary research. This study aimed to study the blood derivative characteristics, leading to clarification of the main substance responsible for SLN marking. Methods Preclinical tests were conducted in wistar rats to evaluate SLN tissue marking. After obtaining hemoglobin, the fraction was evaluated, and lymphatic mapping and SLN identification of the popliteal region were performed. Drainage time, standard concentration, tissue marking after proteolysis, and thermostability were assayed. Histopathological evaluation by optical microscopy following the animal procedure. Box plots were generated for graphic presentation. Results It was found that hemoglobin is the main responsible for the labeling of SLN, and that this labeling process can be optimized by applying 3% nitrite and protease inhibitors to the hemoglobin concentrate for 48h, respecting the drainage time of 2h and maintaining the sample temperature at 25°C. Conclusion This study demonstrates the possible clinical applicability of the hemoderivative protein as a tissue marker in the identification of the sentinel lymph node in early and locally advanced breast cancer. The marking process is optimized by standardizing the homeostatic conditions of the biological marker.</p>

Suggested Reviewers:	Luiz Fernando Bleggi-Torres lftorres@uol.com.br	
	Cícero de Andrade Urban cicerourban@up.edu.br	
	Nasuh Utku Dogan nasuhutkudogan@yahoo.com	
	Polat Dursun pdursun@yahoo.com	
	Oliver Cassell oliver.cassell@ouh.nhs.uk	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (1 6 6 9 4 9 9)	DR Mayara Maia Alves
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	DR Bruno Anderson Matias da Rocha

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Blood-derived marker for breast cancer sentinel lymph node identification: a histopathologic and biochemical study in rats

Mayara Maia Alves¹, Agostinho Câmara Pinheiro², Dayara de Oliveira Silva¹, José Lucas Martins Bezerra², Danilo Damasceno Rocha³, Eduardo Salviano Bezerra⁴, Márcia Valéria Pitombeira Ferreira⁵, Luiz Gonzaga Porto Pinheiro², Bruno Anderson Matias da Rocha¹

¹Department of Biochemistry, Federal University of Ceara, 907 Pici Campus Public Access, Fortaleza, CE, 60020-181, Brazil

²Department of Surgery, College of Medicine, Federal University of Ceara, 1608 Costa Mendes St., 3rd floor, Fortaleza, CE, 60430-140, Brazil

³Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara, 1127 Coronel Nunes de Melo St., Fortaleza, CE, 60430-275, Brazil

⁴Max F. Perutz Laboratories, Center for Molecular Biology, University of Vienna, 1030 Dr. Bohr-Gasse 9, Vienna, Austria

⁵Department of Pathology and Legal Medicine, College of Medicine, Federal University of Ceara, 949 Alexandre Baraúna St., Fortaleza, CE, 60430-160, Brazil

Corresponding author: Mayara Maia Alves. Department of Biochemistry, Federal University of Ceara, 907 Pici Campus Public Access, Fortaleza, CE, 60020-181, Brazil. E-mail: mayaramaia.m@gmail.com Phone: 55-85-99969-43335.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Ethical standards All procedures were conducted in accordance to Brazilian law. The University Research Committee of Ethics in Animal Research approved the study (No. 46/2016).

ABSTRACT

1 **Purpose.** Sentinel lymph node (SLN) biopsy in the surgical treatment of early stage breast cancer is currently
2 employed as part of the routine protocol. Recent studies have shown the use hemosiderin, a new marker derived
3 from the patient's own blood, capable of facilitating the surgical procedure. However, the hypothesis that the
4 blood-derived marker would be hemosiderin arose only from clinical data and preliminary research. This study
5 aimed to study the blood derivative characteristics, leading to clarification of the main substance responsible for
6 SLN marking. **Methods.** Preclinical tests were conducted in wistar rats to evaluate SLN tissue marking. After
7 obtaining hemoglobin, the fraction was evaluated, and lymphatic mapping and SLN identification of the
8 popliteal region were performed. Drainage time, standard concentration, tissue marking after proteolysis, and
9 thermostability were assayed. Histopathological evaluation by optical microscopy following the animal
10 procedure. Box plots were generated for graphic presentation. **Results.** It was found that hemoglobin is the main
11 responsible for the labeling of SLN, and that this labeling process can be optimized by applying 3% nitrite and
12 protease inhibitors to the hemoglobin concentrate for 48h, respecting the drainage time of 2h and maintaining
13 the sample temperature at 25°C. **Conclusion.** This study demonstrates the possible clinical applicability of the
14 hemoderivative protein as a tissue marker in the identification of the sentinel lymph node in early and locally
15 advanced breast cancer. The marking process is optimized by standardizing the homeostatic conditions of the
16 biological marker.

17 **Keywords:** lymph nodes, breast cancer, blood cells, hemoglobin, methemoglobin, tissue marker
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

INTRODUCTION

1 Cancer has complex and multifunctional etiopathogenesis. Epidemiological studies do not provide
2 conclusive evidence, justifying the recommendation of specific prevention strategies [1]. Thus, efforts to
3 improve the numbers related to breast cancer are directed towards an early diagnosis, with the consequences of
4 reducing treatment aggressiveness and mortality rate [2].
5

6 Axillary status is the single most important prognostic factor in early breast tumors. Conventional
7 axillary lymph node dissection is used as a staging and therapy tool [3]. Sentinel lymph node (SLN) biopsy in
8 the surgical treatment of breast cancer is currently employed as part of the routine protocol. This method avoids,
9 in most cases, many patient morbidities caused by axillary emptying [4-9].
10

11 The SLN biopsy requires markers that allow the identification and facilitate the surgical procedure.
12 Among the most used markers are technetium (Tc99), which has the disadvantages of high cost, radioactivity,
13 and the difficulty of mobilizing several professionals [10]; and patent blue, which is related to cases of severe
14 anaphylactic reactions [11].
15

16 Considering SLN markers current innovations, we highlight the use of autologous blood-derived dye
17 (hemosiderin) in the SLN biopsy. The research began after clinical observation of two patients who presented
18 lymphatic vessels mapping in the breast with a reddish color, towards the axillary lymph node. These
19 preliminary experiments found statistically significant and consistent data by comparing patent blue/technetium
20 versus hemosiderin/technetium [12].
21

22 Subsequently, hemosiderin was discovered as a possible SLN marker. Researchers [9,12,13] have
23 evaluated the safety and potential equivalence of hemosiderin use in patients with early and advanced breast
24 cancer, using Tc99 as a positive control. The method efficacy was proven by equivalence determination, thus
25 obtaining similar results in SLN detection when stained with hemosiderin and Tc99 as compared to blue patent
26 and Tc99. No adverse effects were observed in hemosiderin labeling procedures, which was the main advantage
27 when compared to other markers [9,13].
28

29 Hemosiderin, a pigment resulting from the hemoglobin degradation, represents one of the two main
30 forms of intracellular storage of iron. The macrophages of reticuloendothelial system phagocytose the lysed
31 erythrocytes from the solution injected into the subareolar region of the breast and through the lymphatic
32 network of the breast, saturating the lymph node with hemosiderin. This process alters SLN color, allowing its
33 identification during SLN biopsy [12] and when stained with Prussian blue, it reacts with potassium
34 ferrocyanide resulting in a blue-green product (ferric ferrocyanide- consisting of Fe³⁺) [9]. Researchers affirm
35 the hemosiderin viability and applicability as an autologous SLN marker in cases of early and locally advanced
36 tumors [9, 13].
37

38 However, the imprecision of affirmations that the blood product used as SLN marker would be
39 hemosiderin raised questions: (1) would the methemoglobin concentration be a determining factor in the
40 labeling? (2) Is the red blood cells structural integrity necessary for labeling? (3) How the digestion performed
41 by macrophages would be effective for labeling?
42

43 This research aimed to study the blood derivative (hemosiderin) characteristics, leading to clarification
44 of the main substance responsible for SLN marking and improvement of it with pre-clinical tests.
45

MATERIALS AND METHODS

Purification and electrophoresis

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Blood bags delivered by a Brazilian hematology center were used for the collection of washed red
2 blood cells. The erythrocyte concentrate was lysed with ultrapure water (Milli-Q) and centrifuged at 9000 rpm
3 for 10 minutes at 4°C, where the precipitate was discarded. The total extract obtained was dialyzed against a
4 Tris solution of 20 mM pH 7.2 at 25°C, lyophilized, and stored for further experiments.

5
6 To isolate the protein of interest, the carboxymethyl cellulose cation exchange column was used, and
7 proteins contained in the collected fractions were monitored by absorbance at wavelengths 280nm. The
8 unretained fraction was eluted in 20 mM Tris buffer pH 7.2 in the absence of salt, applying 1 mL of the total
9 extract (10 mg/ml) in the 2 mL/min stream. For the elution of the proteins bound to the Chromatographic
10 matrix, a NaCl gradient ranging from 0 to 1 M was performed. The retained fraction readings were performed at
11 280nm (total proteins), 540nm (hemoglobin) and 630nm (methemoglobin).

12
13 To investigate the presence and degree of purity of the hemoglobin concentrate and its derivatives,
14 the samples were subjected to 15% electrophoresis (SDS-PAGE) in non-reducing buffer, following the method
15 of Laemmli [14].

16 **Animal experimental design**

17
18 Adult wistar rats, with 300 g of average weight, were used for this experiment. The assays with [Hb]
19 were performed in triplicate in an experimental surgery laboratory to evaluate SLN tissue marking.

20
21 After process standardization for obtaining [Hb], the fraction obtained was evaluated by an adapted
22 animal model [15, 16], performing lymphatic mapping and SLN identification of the popliteal region. Initially,
23 the animals were duly weighed, appropriately immobilized, and anesthetized with ketamine (0.2 mL) and
24 xylazine (0.2 mL). Subcutaneous injections were then administered: 0.5 mL of blue patent (positive control) and
25 1 mL (10 mg/ml) of the sample to be studied. Subsequently, incisions were made in both hind legs and inguinal
26 region to observe the coloration of lymphatic vessels and of the sentinel lymph nodes. At the end of
27 surgery, euthanasia was performed through cervical dislocation.

28
29 The drainage through the lymphatic vessels and the lymph nodes was macroscopically evaluated for
30 its color. Lymph nodes of the popliteal region were removed for histopathological evaluation by optical
31 microscopy, following the animal procedure.

32 **Determination of biological marker drainage time (hemoglobin concentrate)**

33
34 The positive control and 1 mL (10 mg/ml) of Hemoglobin concentrate were applied. The injection
35 site was massaged for approximately 5 minutes, and different lymphatic system draining periods were observed
36 (1h, 2h, 4h and 6h drainage). After the drainage times of each animal, lymph node marking of the popliteal
37 region was observed macroscopically. Then, they were removed for later histopathological analysis.

38 **Determination of biological marker standard concentration**

39
40 We applied 1 mL of [Hb] at different concentrations (5 mg/ml, 10 mg/ml and 15 mg/ml) and positive
41 control in each animal hind paws. The drainage period, between subcutaneous injection and the incision for
42 popliteal lymph node removal, was of 2 h. Finally, after macroscopic observation through the lymph nodes color
43 of the popliteal region, they were removed for histopathological analysis.

44 **Assay to evaluate the relationship of lymph node tissue marking with methemoglobin concentration**

45
46 We prepared methemoglobin at different concentrations by adding 3% nitrite to the 10 mg/ml
47 hemoglobin solution and allowing contact for different times (15h, 18h, 21h, 24h, 48h and 72h). After contact
48 time, the methemoglobin (met Hb) was quantified based on the evaluation of the solution of Hb (hemoglobin)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

previously stabilized in phosphate buffer M/60, in two specific lengths waveforms for met Hb (630 nm) and oxyhemoglobin (540 nm).

The positive control and 1 ml of the solution (Hb + 3% nitrite) were injected in each of the hind paws of animals. The drainage period between the subcutaneous injection and the incision for withdrawal of popliteal lymph node was of 2h. Finally, after macroscopic observation through the lymph nodes color of the popliteal region, they were removed for histopathological analysis.

Assay to evaluate lymph node tissue marking after biological marker proteolysis

Solutions of the Hb concentrate (10 mg/ml) were prepared in 20 mM Tris buffer pH 7.2. Subsequently, 450 μ L of substrate were transferred to the 27 eppendorfs and 50 μ L of enzymes (trypsin, papain and pepsin) were added to each test group. To initiate the reactions, the samples were preincubated at different temperatures (4°C, 25°C and 37°C for 30 min, 1h and 4h), thus evaluating which temperature and incubation period would be ideal for the enzymatic reactions accomplishment. The assays were performed in triplicates and the results were evaluated by SDS-PAGE electrophoresis. After analysis of the enzymatic reaction that exhibited the greatest number of degradation products through the electrophoretic gels, the animal test described above was performed.

Assay to evaluate lymph node tissue marking after thermostability assay of the biological marker

The samples that would be administered were prepared diluting 10 mg of Hb concentrated in 1 ml of water for injection and exposed to different temperatures (4°C, 25°C, 37°C and 100°C) for 10 minutes, until the completion of the animal test described above.

Optic Microscopy

The popliteal lymph nodes identified in the animals were submitted to dissection, with preservation of the lymph node capsule. Then, lymphoid tissue aspects were observed. The pieces were cleaved and rehydrated in aqueous solutions with increasing concentrations, diaphanized in xylol, embedded and included in histological paraffin. During histopathological examination, semi-serial three levels of histological sections stained with hematoxiline-eosine (HE) were used.

Blade readings were performed and photomicrographed on the Olympus BX 60 light microscope coupled to Axio CAM HRC camera using Zeiss KS 400 software. A pathologist analyzed the sections, observing the number of macrophages containing Hb concentrate traces phagocytosed. The cases were considered positive for tissue marking of popliteal lymph node when macroscopically the presence of a reddish color was observed in the tissue, what was confirmed and classified by the visualization of histopathological macrophages.

The microscopic markings were classified as follows: no marking/little marking (0-2 macrophages per field), regular (3-9 macrophages), good (10-19 macrophages), very good (20-29 macrophages), and excellent (30 or more macrophages). The standard micrographics of the positive (blue patent), negative (saline) and purified (hemoglobin concentrate) markers controls were used as parameters.

Confocal Microscopy

A RAW 264.7 macrophages strain of mice, previously obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank, was used for this study. Cells were maintained in cryopreservation (liquid nitrogen) in freezing solution composed of Dulbecco Modified Eagle Medium supplemented with 10% dimethylsulphoric and 90% fetal bovine serum.

The cells were plated on glass bottom plates (P35G-010-C, MatTek Corporation) at the concentration of 5×10^4 cells/ml and incubated with 10 mg/ml Hb concentrate for 24 h.

After this period, the cells were washed with medium and then analyzed by the confocal microscope LSM 710 (Carl Zeiss) using objective Plan-Apochromat 6x / 1:40 Oil DIC M27 and lasers 405 nm (in 403-490 nm) 488 nm (at 492-630 nm).

Statistical Analysis

The categorical variables were exposed in frequency and prevalence rate to investigate associations between the macroscopic / histopathological tissue marking and the sentinel lymph node hemoglobin concentration. Scatter plots and boxplots were constructed to demonstrate the behavior of the variables. For the data analysis, the software Microsoft Excel and R 3.4.2 were used.

RESULTS

Purification

The total extract had high yield (1.76 mg/ml of total proteins). The electrophoresis showed the presence of the main erythrocyte proteins: high concentration of hemoglobin - alpha and beta chains (15 and 16 kDa / pI 8.69 and 7.28, respectively) and its isoforms with wide variation of pI, met Hb reductase (30 kDa / pI 6.8) and carbonic anhydrase (29 kDa / pI 6.8) (Fig. 1).

Total extract purification with the aid of CM cation exchange chromatography proved to be efficient, presenting a single retained fraction, and the protein of interest was eluted to 200 μ L of salt (Fig. 2a). The retained fraction mainly corresponds to hemoglobin. The polyacrylamide gel electrophoresis confirms the presence of α and β chains only, forming monomers (15 kDa and 16 kDa, respectively) and dimers (~32 kDa) that constitutes hemoglobin (Fig. 2b).

Biological applications of hemoglobin concentrate

Determination of biological marker drainage period (hemoglobin concentrate)

After application of 0.5mL of blue patent and 1 mL of the hemoglobin concentration, draining for different periods (1h, 2h, 4h, and 6h), it was observed that 2h would be the ideal time of drainage between the injection site and the lymph node removal. It presented a more evident tissue marking (Fig. 3) and an increase in the number of macrophages with traces of Hb concentrate in its cytoplasm (Fig. 3).

Determination of biological marker standard concentration

Following the macroscopic labeling of LPs: 5 mg/ml (regular), 10 mg/ml (very good) and 15 mg/ml (good) and histopathological markings: 5 mg/ml (6.2 macrophages per field), 10 mg/ml (14.6 macrophages per field) and 15 mg/ml (12.2 macrophages per field), it was determined that the standard concentration would be the injection of 10 mg/ml Hb concentrate. This permitted better macroscopic labeling and the presence of a greater number of macrophages with traces of [Hb] in their cytoplasm (Fig. 4).

Assay to evaluate the relationship of lymph node tissue marking with methemoglobin concentration

Obtaining the solutions at the recommended contact times revealed different Hb and met Hb measurements. The increase in the concentration of met Hb occurred continuously and inversely proportional to the increase in Hb concentration, reaching the peak within 48h of contact time with the solution of concentrate of Hb + nitrite at 3%. The concentration of met Hb decreased within 72h of contact.

After applications of samples with different concentrations of met Hb, it was observed that increasing met Hb concentration is directly proportional to the increase in the sentinel lymph node coloring: 2.67mg/mL met Hb (regular tissue marking, 7 macrophages), Metaphenol 3.75 mg/mL (regular tissue marking, 9.4 macrophages) (Fig. 5b), 6.11 mg/mL met Hb (good tissue marking) (Fig. 5c), 6.67 mg/ml (very good tissue

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 marking, 26.8 macrophages) (Fig. 5d), ~10 mg/ml (excellent tissue marking, 32.87 macrophages) (Fig. 5e), and
2 6.47 mg/mL (good tissue marking, 21.8 macrophages) (Fig. 5f). This was reaffirmed in the histopathological
3 sections with the presence of subcapsular sinuses presenting high concentration of macrophages stained with
4 met Hb. Thus, increasing contact time of 3% nitrite with the sample for up to 48 hours increased the
5 concentration of met Hb progressively, while increasing tissue coloration and gradually increasing the number
6 of macrophages with traces of the solution in their cytoplasm (Fig. 5a and Fig. 6). After 48 h, a decrease in the
7 met Hb concentration and a decrease in the macroscopic and microscopic lymphoid tissue marking (Fig. 5f and
8 Fig. 6) were observed.

9
10
11 The solutions that had a higher concentration of Hb and a lower concentration of met Hb showed less
12 effective tissue staining and a lower number of macrophages with residual in their cytoplasm when compared to
13 lymph nodes stained with solutions with a high concentration of met Hb (Fig. 5 and Fig. 2).

14 *Assay to evaluate the tissue marking of the sentinel lymph node after proteolysis of the biological marker*

15 We used the optimized trypsin (37°C for 4h) in the sample containing [Hb], to evaluate the necessity
16 of the protein integrity of the Hb in the tissue marking of the sentinel lymph node. In animal tests, the sample
17 was injected (trypsin + [Hb]) and drained for 2 hours until the incision for removal of the popliteal lymph node,
18 always having as positive control the other hind leg, in which the patent blue was injected. Finally, the absence
19 of tissue marking and macrophages with traces of the sample and vacuoles in their cytoplasm were observed.

20 *Assay to evaluate tissue marking of sentinel lymph node after thermostability assay of the biological marker*

21 The application of 0.5mL of blue patent (positive control) and 1mL of the hemoglobin concentrate, at
22 different temperatures, draining for 2h, observed that 25°C would be the ideal temperature for higher stability of
23 the Hb concentrate, presenting very good tissue marking (Fig. 7b) and an increase in the number of
24 macrophages with traces of Hb concentrate in their cytoplasm (22.8 macrophages per field) (Fig. 7 and Fig. 8).

25 Macroscopically, Hb concentrates maintained at temperatures 4°C (Fig. 7a) and 37°C (Fig. 7c) showed
26 regular tissue marking, which is confirmed by the presence of 13.2 macrophages per field and presence of
27 vacuoles in their cytoplasm, and 7.4 macrophages per field, respectively (Fig. 7).

28 After draining the Hb concentrate at 100°C, it was observed that there was no macroscopic marking
29 (Fig. 7d), as well as a sharp decrease in the number of macrophages with presence of [Hb] in the cytosol (1.13
30 macrophages per field) and an increase of vacuoles in their cytoplasm (Fig. 7 and Fig. 8).

31 *Confocal microscopy*

32 It was observed that the cells stimulated by the Hb concentrate exhibited significant expression when
33 compared to the negative control (macrophages in culture medium) (Fig. 9a), where the cells exposed to [Hb]
34 were quite reactive (pseudopodia) and presented vesicles that emitted green fluorescence (Fig. 9b).

35 **DISCUSSION**

36 The isolation process of hemosiderin has been tried for decades and involves several steps [17-19]. It
37 is not possible to isolate hemosiderin as elementarily as the method described by other authors [9, 12, 13]. Such
38 affirmation was revalidated after the electrophoresis of this study. Nevertheless, a pool of erythrocyte proteins
39 was observed.

40 The major soluble protein found in erythrocytes is hemoglobin, being represented by approximately
41 95% of the dry weight of an erythrocyte [20-22], corroborating with the result observed in 2D electrophoresis
42 (high hemoglobin concentration and its isoforms with wide variation of pI).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Analyzing the biochemical characteristics of Hb, the purification used was ion exchange
2 chromatography, where the Fe-III present in the heme prosthetic group of Hb diluted in the column equilibrium
3 solution (20 mM Tris-HCl pH 7.2) possesses high affinity for cationic resin (Carboxymethylcellulose) [23,24],
4 allowing for a better separation of hemoglobin from other proteins. CM purification produced high yields of Hb
5 concentrate (0.5278 mg/mL) in a timely manner, reducing contaminants and exhibiting only α and β forming
6 monomers.
7

8
9 To perform the sentinel lymph node biopsy in *wistar* rats, it was necessary to standardize the *in vivo*
10 method. This was followed by an adapted BLS animal protocol, as recommended by Oliveira et al. [15] and
11 Woyfnorth and Flecknell [25], when we injected, into the subdermal layer of the hind legs of the rats, patent
12 blue (positive control) and Hb. Initially, it was standardized that 2h would be the ideal drainage time when
13 compared to the other drainage times (1h, 4h and 6h). Ultimately, in order to evaluate the saturation threshold of
14 the lymphoid tissue for a more efficient marking, it was determined that the standard concentration would be 10
15 mg/mL Hb concentrate, which had a better macroscopic marking and the presence of the greatest number of
16 macrophages when compared to the other concentrations.
17

18 Since the extracellular medium contains proteases (enzymes that catalyze hydrolytic cleavage of
19 peptide bonds) and other degradative enzymes, and that after erythrocyte hemolysis the released proteins can be
20 inactivated [26], it was sought to evaluate how much the proteolytic enzymes could interfere directly in the
21 tissue marking. After the animal test with the solution containing the optimized Hb concentrate and trypsin, the
22 absence of tissue marking was observed and, in the histopathology, there was a reduced number of macrophages
23 with traces of the sample and with vacuoles in the cytoplasm.
24

25 Analyzing the results obtained *in vivo*, we conclude that, for effective tissue marking, it is important
26 to maintain the protein integrity of the sample to be injected, requiring the use of protease inhibitors in the Hb
27 concentrate. Thus, a potentiation of the marking in the lymph node can be guaranteed. It is known that
28 coadministration of proteolytic enzyme inhibitors is a possible strategy for increasing the oral bioavailability of
29 peptides and proteins [27-29]. However, the use of proteolytic inhibitors conjugated to the new biological
30 marker requires attention and future studies, since most of them have high toxicity [30].
31

32 Although the thermal stability of proteins varies greatly, some of them slowly denature above 25°C
33 [22]. Due to the high thermal variability of the erythrocyte proteins, it was evaluated at which temperature the
34 Hb concentrate would be more stable. We found that, at 25°C, the highest stability of the sample was reached.
35

36 Since the patients of Vasques et al. [9] presented magnetic hypersensitivity in the axillary lymph node
37 after the injection of the "hemosiderin" marker and that met Hb is the only erythrocyte derivative emitting
38 magnetic hypersignal, it was sought to evaluate the involvement of met Hb in the tissue marking of lymph node
39 by *in vivo* assays with concentrations of met Hb. The Hb concentrate samples submitted to a longer contact time
40 with nitrite presented better tissue marking results and an increase in the number of macrophages with traces of
41 the solution. We concluded that met Hb is the main erythrocyte protein responsible for optimized marking of
42 lymphoid tissue, and can be absorbed more efficiently than hemoglobin, consequently obtaining the best
43 macroscopic and microscopic marking.
44

45 Once the protein responsible for tissue marking of the sentinel lymph node was identified,
46 experiments were performed using confocal microscopy to confirm histopathological results, evaluating the
47 presence of traces of hemoglobin in the cytoplasm or extracellular matrix of the macrophages *in vivo*, using 540
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

nm of intensity of fluorescence. After stimulation of the phagocytic cells with 10 mg/mL [Hb] for 24h, at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity, the macrophages exposed to [Hb] were quite reactive (increase in number of pseudopods) and had vesicles that emitted green fluorescence, which were supposed to be phagosomes with hemoglobin content.

This study demonstrated the possible clinical applicability of the hemoderivative protein as a tissue marker in the identification of the sentinel lymph node in cases of early and locally advanced breast cancer, as presented by Vasques [9] and Aguiar et al. [13]. In addition, it was concluded that the marking process is optimized by standardizing the homeostatic conditions of the biological marker.

References

1. Blackadar CB (2016) Historical review of the causes of cancer. *World J Clin Oncol* 7(1):54-86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>
2. Molina L, Dalben I, De Luca LA (2003) An analyze the opportunities of early detection of breast cancer. *Rev Assoc Med Bras* 49(2):185-190. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302003000200039>
3. Orucevic A, Reddy VB, Bloom KJ, Bitterman P, Magi-Galluzzi C, Oleske DM, Phillips M, Gould VE, Cobleigh M, Wick MR, Gattuso P (2002) Predictors of lymph node metastasis in T1 breast carcinoma, stratified by patient age. *Breast J* 8(6):349-355. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4741.2002.08604.x>
4. American Cancer Society (2017) Invasive breast cancer (IDL/ILC). <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer/invasive-breast-cancer.html>. Accessed 17 Jun 2020.
5. Fisher B (1980) Findings from NSABP protocol no. B- 04 comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. I. Radiation compliance and its relation to treatment outcome. *Cancer* 46:1-13. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19800701\)46:1<1::aid-cncr2820460102>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19800701)46:1<1::aid-cncr2820460102>3.0.co;2-3)
6. Fisher B (2002) Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Eng J Med* 347(8):567-575. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020128>
7. Tiezzi DG (2007) Breast-conserving surgery for breast cancer. *Rev Bras Ginecol Obstet* 29(8):428-434. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032007000800008>
8. Shwartz, GF, Giuliano AE, Veronesi U (2002) Proceedings of the Consensus Conference on the Role of Sentinel Lymph Node Biopsy in Carcinoma of the Breast. April 19-22, 2001, Philadelphia, PA, USA. *Cancer* 94:2542-2551. <https://doi.org/10.1002/cncr.10539>
9. Vasques PHD (2016) Comparison of hemosiderin with technetium - 99 in the identification of breast cancer sentinel lymph node. Dissertation, Federal University of Ceara.
10. Mayes E, Douek M, Pankhurst Q (2012) Surgical magnetic systems and tracers for cancer staging. In: Thanh NTK (ed). *Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications*. CRC Press, New York, pp 541-556.
11. Dang Y, Engel J (2011) Patent blue dye and an atypical anaphylactic reaction after sentinel lymph node biopsy in early breast cancer. *Breast J* 18:91-92. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2011.01194.x>
12. Pinheiro LG, Oliveira Filho RS, Vasques PHD, Filgueira PHO, Aragão DHP, Barbosa PME, Beserra HEO, Cavalcante RV (2009) Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cir Bras* 24(6):432-436. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000600002>

13. Aguiar PHW, Aquino RGF, Alves MM, Correia JMS, Oliveira ALS, Viana Júnior AB, Pinheiro LGP (2017) Identification of the sentinel lymph node using hemosiderin in locally advanced breast cancer. *Rev Col Bras Cir* 44(6):612-618. <https://doi.org/10.1590/0100-69912017006013>
14. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
15. Oliveira Filho RS, Paiva GR, Wagner J, Nogueira SA (2003) Experimental model in the rat for sentinel node biopsy. Comparison between dextran and phytate. *Acta Cir Bras* 18(3):15-21. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502003001100003>
16. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A (2008) Lymph node mapping in the mouse. *J Immunol Methods* 332(1-2):170-174. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.11.012>
17. McKay RH, Fineberg RA (1964) Horse spleen hemosiderin: I. Isolation. *Arch Biochem Biophys* 104:487-495. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90493-x](https://doi.org/10.1016/0003-9861(64)90493-x)
18. Ludewig S, Franz SW (1970) Hemosiderin V: The occurrence of heme and lipids in hemosiderin. *Biochem Biophys* 138(2):397-407. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90362-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90362-0)
19. Weir MP, Gibson JF, Peters TJ (1984) Haemosiderin and tissue damage. *Cell Biochem Funct* 2(4):186-194. <https://doi.org/10.1002/cbf.290020402>
20. Rodwell V, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW (2015) *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill Medical, New York.
21. Azevedo MRA (2014) *Hematologia Básica: Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial*. Revinter, Rio de Janeiro.
22. Voet D, Voet JG (2011) *Biochemistry*, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
23. Kanaori K, Tajiri Y, Tsuneshige A, Ishigami I, Ogura T, Tajima K, Neya S, Yonetani T (2011) T-quaternary structure of oxy human adult hemoglobin in the presence of two allosteric effectors, L35 and IHP. *Biochim Biophys Acta* 1807(10):1253-1261.
24. Abrão A (1972) *Operações de Troca Iônica*. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
25. Woyfnorth HB, Flecknell PA (1992) Specific surgical operations. In: Woyfnorth HB (ed) *Experimental and surgical technique in the rat*. Academic Press, San Diego, pp 257-263.
26. Nelson DL, Cox MM (2017) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th ed. WH Freeman, New York.
27. Langguth P, Bohner V, Heizmann J, Merkle HP, Wolfram S, Amidon GL, Yamashita S (1997) The challenge of proteolytic enzymes in intestinal peptide delivery. *J Controlled Release* 46(1-2):39-57. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01586-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01586-6)
28. Kimura T, Sato K, Sugimoto K, Tao R, Murakami T, Kurosaki Y, Nakayama T (1996) Oral administration of insulin as poly(vinyl alcohol)-gel spheres in diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 19(6):897-900. <https://doi.org/10.1248/bpb.19.897>.
29. Morishita I, Morishita M, Takayama K, Machida Y, Nagai T (1992) Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. *Int J Pharm* 78(1-3):9-16. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90349-7](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90349-7)
30. Silva C, Ribeiro A, Ferreira D, Veiga F (2002) Oral delivery system for peptides and proteins: I. Approaches to improve oral bioavailability. *Rev Bras Cienc Farm* 38(2):125-140. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322002000200002>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure captions

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Fig. 1** Total extract proteomic map
- Fig. 2** (a) Chromatographic profile in cellulose matrix. 1 mL of total extract was applied to the chromatographic matrix. The matrix was previously equilibrated with 20 mM Tris pH 7.2 obtaining the unretained fraction (PI) and the PII fraction after elution with 200 mM NaCl. Column volume of 3 mL. Volume of fractions collected: 2 mL. Wavelengths: 280 nm (total proteins); 540 nm (hemoglobin) and 630 nm (methemoglobin). (b) Electrophoretic profile of 15% SDS-PAGE of molecular markers proteic fractions, total extract and after CM cationic chromatography (5,6,7,8,9). Abbreviations used: M, molecular markers; ET, total extract; G100, hemoglobin concentration fraction after exclusion chromatography, and 5,6,7,8,9 aliquots of the PII fraction of the hemoglobin concentrate after cation chromatography
- Fig. 3** *In vivo* assays of draining period for the lymph nodes of the popliteal region. Macroscopic and histopathological examination of the popliteal lymph nodes presented satisfactory tissue marking after application of the [Hb] drain for 2h. Histopathological sections with the subcapsular sinus macrophages showed high concentration in the 2h drain (very good) decreasing with increasing drainage time: 4h (good) and 6h (regular)
- Fig. 4** Tests *in vivo* in order to evaluate the standard concentration for lymph node tissue marking of the popliteal region. Injection of 1 mL of purified and 0.5 mL of blue patent (positive control) into each hind paw, respectively. Macroscopic and histopathological (40 x) view of the popliteal lymph node showed more effective tissue marking after application of 10 mg/ml of [Hb], drained for 2 h
- Fig. 5** *In vivo* assays to macroscopically and histopathologically evaluate the ideal met Hb concentration for effective lymph node staining
- Fig. 6** Statistical significance of the number of macrophages with traces of met Hb concentrate in their cytoplasm, drained for 2h at different concentrations (A - 2.67 mg/mL, B - 3.75 mg/mL, C - 6.11 mg/mL, D - 6.67 mg/mL, E - 9.85 mg/mL, F - 10 mg/mL, G - 9.98 mg/mL and H - 6.47 mg/mL), wherein the concentration of $\cong 10$ mg/mL has the highest macroscopic tissue marking and the highest number of labeled macrophages
- Fig. 7** *In vivo* assays with the purpose of evaluating the standard thermostability for tissue marking of the lymph node of the popliteal region
- Fig. 8** Statistical relevance of the number of macrophages with traces of Hb concentrate in their cytoplasm, drained for 2h, maintained at different temperatures (4°C, 25°C, 37°C and 100°C), where the temperature of 25°C has the highest number of macrophages per field
- Fig. 9** Images with confocal microscopy of the presence of phagosomes containing Hb concentrate

Fig 1

[Click here to access/download:Figure:Figure 1.jpg](#)

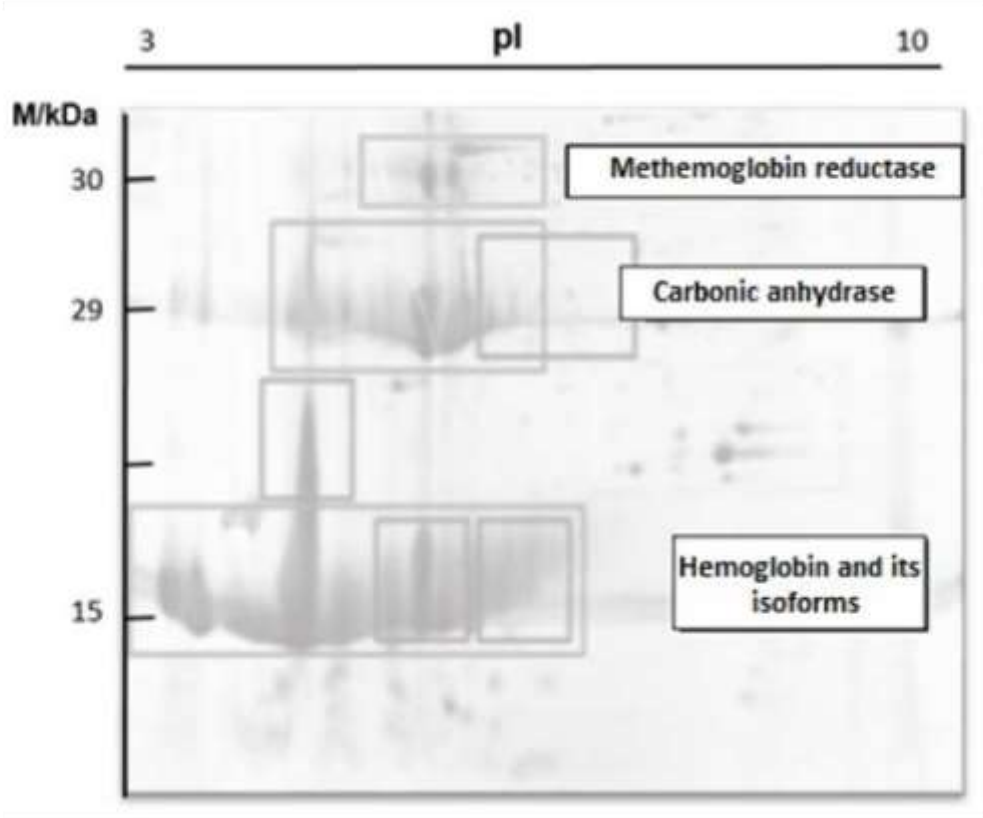


Fig 2

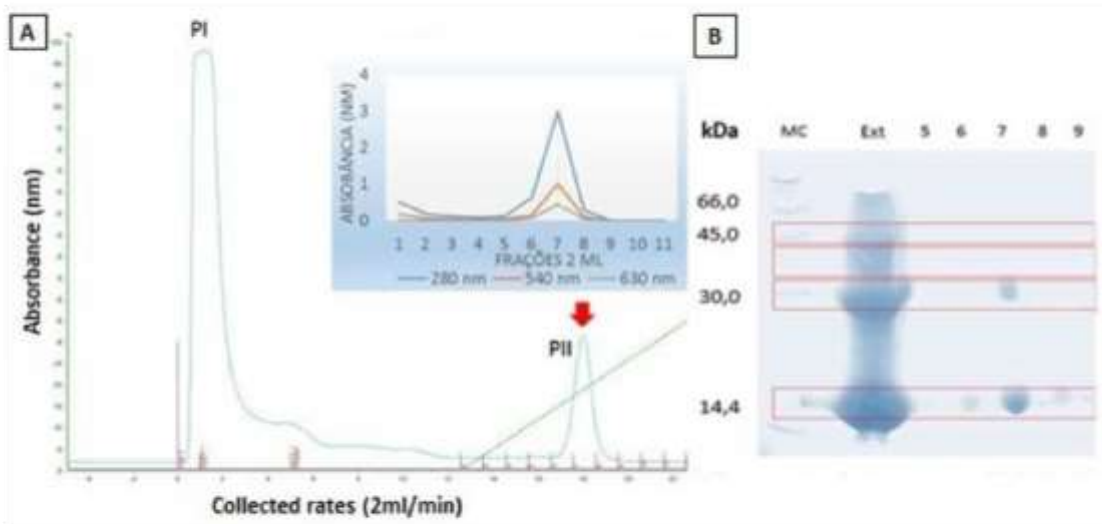
[Click here to access/download:Figure:Figure 2.jpg](#)

Fig 3

[Click here to access/download;Figure;Figure 3.jpg](#)


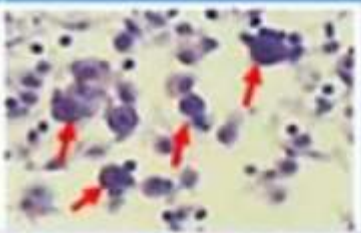

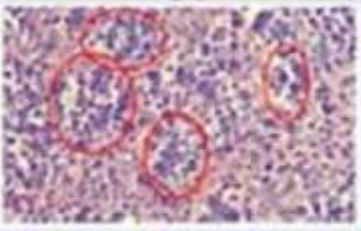

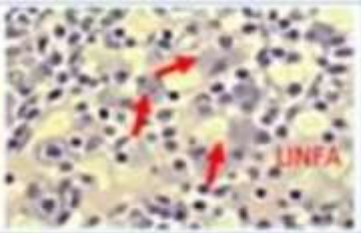

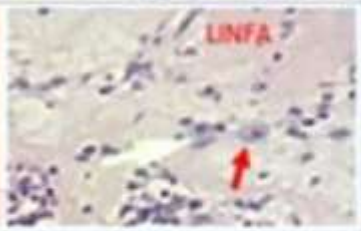
Drenaige time	Macroscopic marking by [Hb]	Histopathological sections
1h		
2h		
4h		
6h		

Fig 4

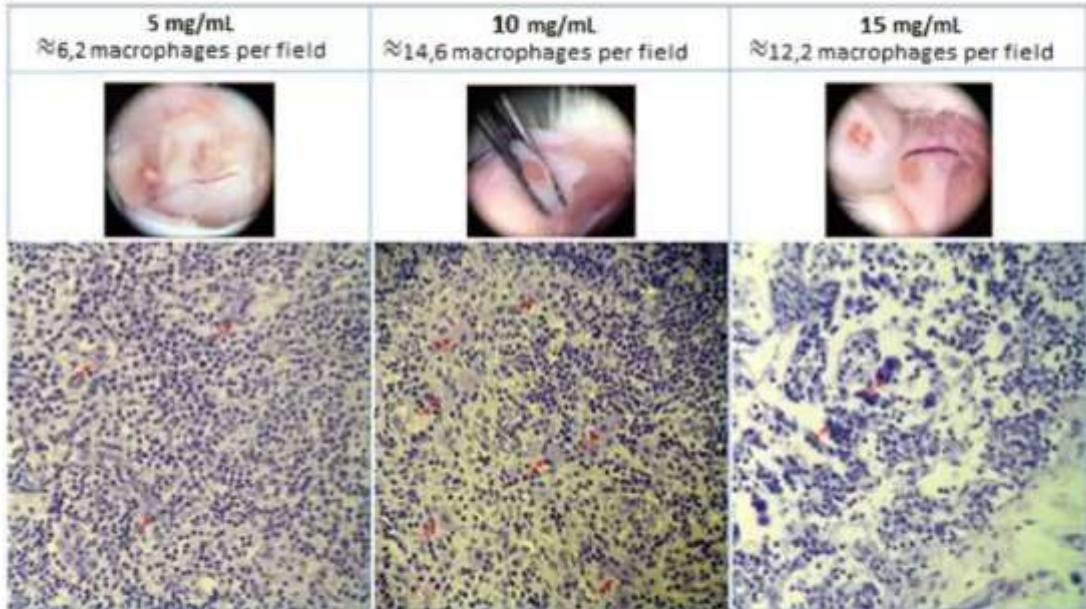
[Click here to access/download;Figure;Figure 4.jpg](#)

Fig 5

[Click here to access/download;Figure;Figure 5.jpg](#)

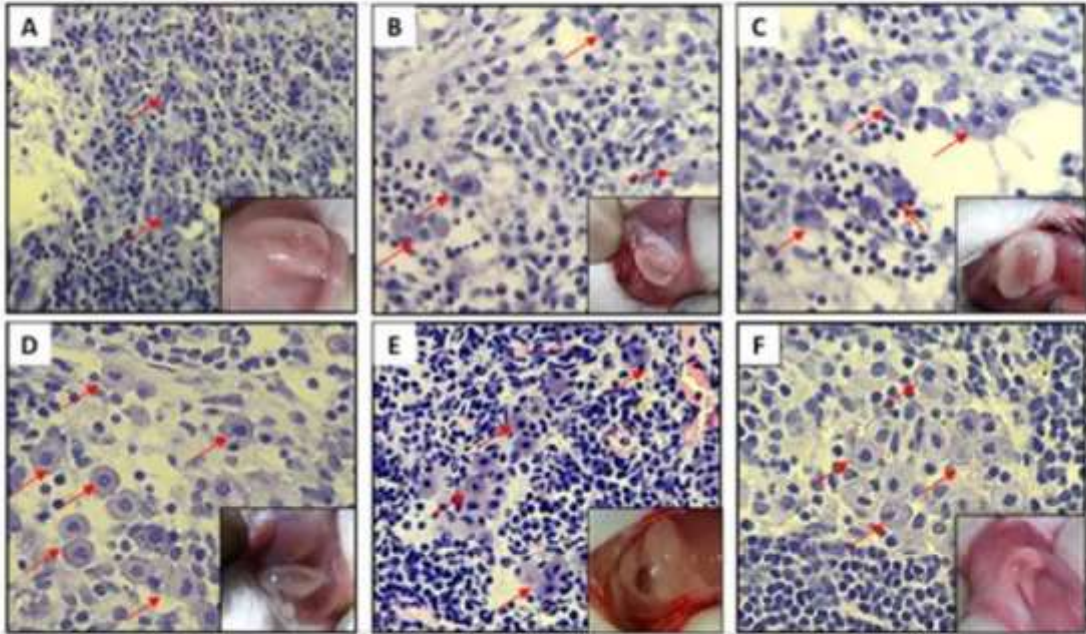


Fig 6

[Click here to access/download;Figure;Figure 6.jpg](#)

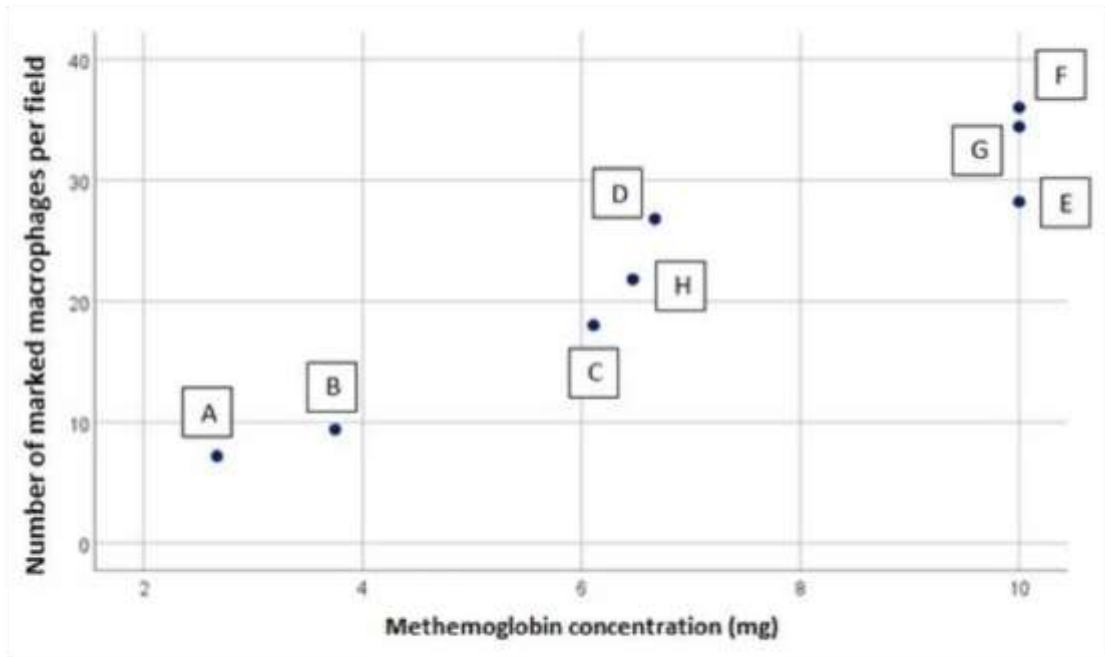


Fig 7

[Click here to access/download;Figure;Figure 7.jpg](#)

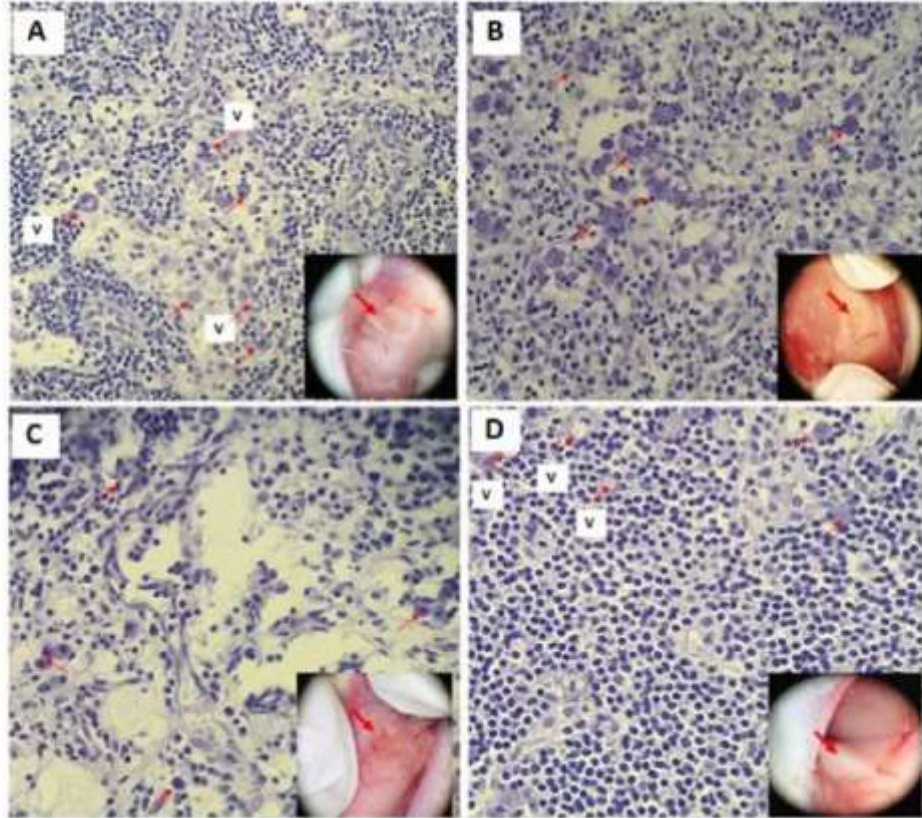


Fig 8

[Click here to access/download;Figure;Figure 8.jpg](#)

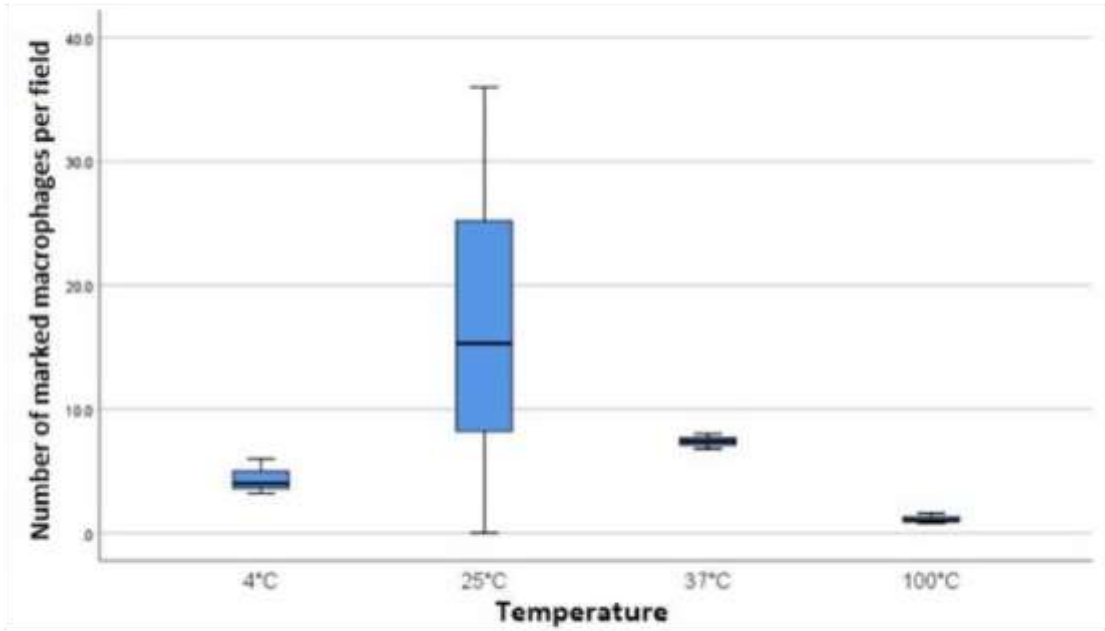
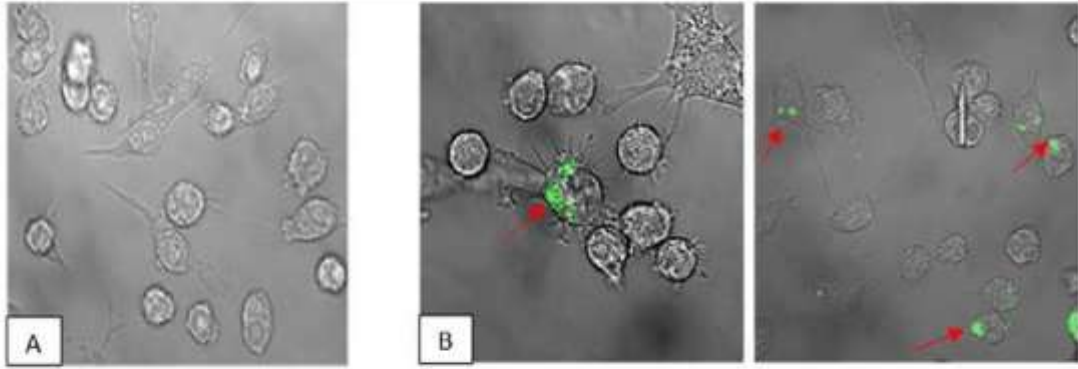


Fig 9

[Click here to access/download;Figure;Figure 9.jpg](#)

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Breast Cancer Research and Treatment  Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Author Username: MAYARA

Author's Decision

Thank you for approving the changes to "Blood-derived marker for breast cancer sentinel lymph node identification: a histopathologic and biochemical study in rats." by the Editorial Office.

[Main Menu](#)

Breast Cancer Research and Treatment  Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • PRIVACY

Role: Author Username: MAYARA

Submissions Being Processed for Author **Mayara MAIA Alves, PhD**

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	BREA-D-20-01139	Blood-derived marker for breast cancer sentinel lymph node identification: a histopathologic and biochemical study in rats.	09 Aug 2020	09 Aug 2020	Submitted

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

[<< Author Main Menu](#)

ANEXO A – CLASSIFICAÇÃO TNM

TNM- Classificação Clínica	
T – Tumor primário	
TX	Não há evidência de tumor primário
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	<p>Carcinoma <i>in situ</i>:</p> <p>Tis (CDIS) Carcinoma ductal <i>in situ</i></p> <p>Tis (CDLIS) Carcinoma lobular <i>in situ</i></p> <p>Tis (Paget) Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama</p>
Nota: A doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor	
T1	<p>Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão.</p> <p>T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão.</p>
<p>Nota: Microinvasão é a extensão de células neoplásicas além da membrana basal, alcançando os tecidos adjacentes, sem focos tumorais maiores do que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há focos múltiplos de microinvasão, somente o tamanho do maior foco é utilizado para classificar a microinvasão. (Não usar a soma dos focos individuais) A presença de múltiplos focos de microinvasão deve ser anotada como se faz com os carcinomas invasores extensos múltiplos</p> <p>T1a Com mais de 0,1 cm, até 0,5 cm em sua maior dimensão</p> <p>T1b Com mais de 0,5 cm, até 1 cm em sua maior dimensão</p> <p>T1c Com mais de 1 cm, porém não mais de 2 cm em sua maior dimensão</p>	
T2	Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4	<p>Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele, somente como descritos em T4a a T4d</p> <p>Nota: A parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui o músculo peitoral</p> <p>T4a Extensão à parede torácica</p>

	<p>T4b Edema (inclusive "pele de laranja" 'peau d'orange'), ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama</p> <p>T4c Ambos (T4a e T4b), acima</p> <p>T4d Carcinoma inflamatório</p>
<p>Nota: O carcinoma inflamatório da mama é caracterizado por um endurecimentodifuso e intenso da pele da mama com bordas erisipelóides, geralmente sem massa tumoral subjacente. Se a biópsia de pele for negativa e não existir tumor primário localizado mensurável, o carcinoma inflamatório clínico (T4d) é classificado patologicamente como pTX. A retração da pele, do mamilo ou outras alterações cutâneas, exceto aquelas incluídas em T4b e T4d, podem ocorrer em T1, T2 ou T3, sem alterar a classificação.</p>	
<p>N - Linfonodos Regionais</p>	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (p. ex., por terem sido previamente removidos)
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral (ais), móvel(eis)
N2	Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)
	<p>N2a Metástase em linfonodo(s) axilar(es) fixos uns aos outros ou a outras estruturas</p> <p>N2b Metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)</p>
N3	Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s).

	<p>N3a Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es)</p> <p>N3b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilares</p> <p>N3c Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)</p> <p>Nota: *cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia)</p>
M - Metástase à Distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	<p>Metástase à distância</p> <p>A categoria M1 pode ser adicionalmente especificada de acordo com as seguintes notações:</p> <p>Pulmonar PUL (C34)</p> <p>Medula óssea MO [MAR](C42.1)</p> <p>Óssea OSS (C40, 41)</p> <p>Pleural PLE (C38.4)</p> <p>Hepática HEP (C22)</p> <p>Peritoneal PER (C48.1,2)</p> <p>Cerebral CER [BRA] (C71)</p> <p>Supra-renal (Adrenal) ADR (C74)</p> <p>Linfonodal LIN [LYM](C77)</p> <p>Pele CUT [SKI](C44)</p> <p>Outras OUT [OTH]</p>
TNM- Classificação Patológica	
pT - Tumor Primário	
<p>A classificação histopatológica requer o exame do carcinoma primário sem tumor macroscópico nas margens de ressecção. Um caso pode ser classificado como pT se houver somente tumor microscópico em uma margem. As categorias pT correspondem às categorias T.</p> <p>Nota: Ao se classificar a categoria pT, o tamanho do tumor é a medida do componente invasivo. Se há um grande componente in situ (p. ex., 4 cm) e um pequeno componente invasor (p. ex., 0,5 cm), o tumor é codificado como pT1a.</p>	
pN - Linfonodos Regionais	

pNX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (não removidos para estudo ou previamente removidos)
pN0	Ausência de metástase em linfonodos regionais* Nota: *Casos somente com células tumorais isoladas (CTI [ITC]) nos linfonodos regionais são classificados como pN0. As CTI [ITC] são células tumorais únicas ou em pequenos grupamentos celulares, não maiores que 0,2 mm em sua maior dimensão, que são geralmente detectadas por imuno-histoquímica ou métodos moleculares, mas que poderiam ter sido verificados pela coloração de rotina (H&E). As CTI [ITC], tipicamente, não mostram evidência de atividade metastática, p. ex., proliferação ou reação estromal.
pN1mi	Micrometástase (maior que 0,2 mm, porém não maior que 2 mm em sua maior dimensão)
pN1	Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), e/ou linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente* pN1a Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) incluindo pelo menos um maior que 2 mm em sua maior dimensão pN1b Metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente* pN1c Metástase em 1-3 linfonodos axilares e metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente* Notas: Notas: *não clinicamente aparente = não detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia).
pN2	Metástase em 4-9 linfonodos axilares homolaterais, ou em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), clinicamente aparente™, na ausência de metástase em linfonodos axilares

	<p>Notas: TM clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia) ou macroscopicamente visível patologicamente.</p> <p>pN2a Metástase em 4-9 linfonodos axilares incluindo, pelo menos, um maior que 2 mm</p> <p>pN2b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), clinicamente aparente, na ausência de metástase em linfonodos axilares</p>
pN3	<p>Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares homolaterais; ou em linfonodos infra-claviculares homolaterais; ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais de 3 linfonodos axilares clinicamente negativos, metástase microscópica em linfonodos mamários internos; ou em linfonodos supraclaviculares homolaterais.</p> <p>pN3a Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um maior que 2 mm) ou metástase em linfonodos infraclaviculares</p> <p>pN3b Metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na presença de linfonodos axilares positivos; ou metástase em mais de 3 linfonodos axilares e em linfonodos mamários internos com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente</p> <p>pN3c Metástase em linfonodos supraclaviculares</p>
pM - Metástase à distância	
MX	A presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Metástase à distância

Fonte: SOBIN, L. H; et al. **TNM classification of malignant tumors**. Wiley-Blackwell, p.181-193, 2009.

A 8ª edição, publicada em 2017, trouxe algumas modificações, as quais estão especificadas abaixo.

As modificações baseiam-se em **níveis de evidência da AJCC**:

– **Nível I**: evidência disponível a partir de estudos internacionais e nacionais bem delineados, bem conduzidos, com população adequada e com desfechos e

tratamentos apropriados; são aceitos estudos prospectivos e retrospectivos baseados em registros populacionais; os estudos devem ser avaliados em relação à metodologia e não à cronologia;

– **Nível II:** a evidência disponível é obtida a partir de pelo menos 1 estudo grande, bem delineado e bem conduzido, em população de pacientes apropriada, com desfechos apropriados e com validade externa;

– **Nível III:** a evidência disponível é problemática devido a um ou mais fatores, como número, tamanho ou qualidade dos estudos individuais; resultados inconsistentes entre estudos individuais; população não apropriada avaliada em um ou mais estudos; ou desfechos não apropriados avaliados em um ou mais estudos;

– **Nível IV:** evidência insuficiente devido à ausência de estudos apropriados.

Grupos de estadiamento anatômicos e prognósticos

1. **Grupo de Estadiamento Anatômico** – baseado apenas na extensão do tumor, definida pelas categorias T (tamanho do tumor), N (presença de acometimento de linfonodos) e M (presença ou ausência de metástases);
2. **Grupo de Estadiamento Prognóstico** – baseado em populações de pacientes com câncer de mama que receberam tratamento apropriado com hormonioterapia e/ou quimioterapia; inclui o TNM anatômico associado ao grau tumoral e ao *status* dos biomarcadores HER2, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP).

Grupo de Estadiamento Prognóstico (GEP)							
T	N	M	Grau	HER2*	RE	RP	GEP
Tis	N0	M0	1-3	qualquer	qualquer	qualquer	0
T1	N0	M0	1	positivo	qualquer	qualquer	IA
T1	N0	M0	1-2	negativo	Positivo	positivo	IA
T1	N0	M0	2	positivo	Positivo	positivo	IA
T1	N0	M0	3	positivo	Positivo	qualquer	IA
T0-1	N1mi	M0	1	positivo	qualquer	qualquer	IA
T0-1	N1mi	M0	1-2	negativo	Positivo	positivo	IA
T0-1	N1mi	M0	2	positivo	Positivo	positivo	IA
T0-1	N1mi	M0	3	positivo	Positivo	qualquer	IA

T1-2**	N0	M0	1-2	negativo	Positivo	qualquer	IA
T1	N0	M0	1	negativo	Positivo	negativo	IB
T1	N0	M0	1	negativo	Negativo	positivo	IB
T1	N0	M0	2	positivo	Positivo	negativo	IB
T1	N0	M0	2	positivo	Negativo	qualquer	IB
T1	N0	M0	2	negativo	Negativo	positivo	IB
T1	N0	M0	3	positivo	Negativo	qualquer	IB
T1	N0	M0	3	negativo	Positivo	positivo	IB
T0-1	N1mi	M0	1	negativo	Positivo	negativo	IB
T0-1	N1mi	M0	1	negativo	Negativo	positivo	IB
T0-1	N1mi	M0	2	positivo	Positivo	negativo	IB
T0-1	N1mi	M0	2	positivo	Negativo	qualquer	IB
T0-1	N1mi	M0	2	negativo	Negativo	positivo	IB
T0-1	N1mi	M0	3	positivo	Negativo	qualquer	IB
T0-1	N1mi	M0	3	negativo	Positivo	positivo	IB
T2	N0	M0	1-3	positivo	Positivo	positivo	IB
T2	N0	M0	1-2	negativo	Positivo	positivo	IB
T1	N1	M0	1-3	positivo	Positivo	positivo	IB
T1	N1	M0	1-2	negativo	Positivo	positivo	IB
T2	N1	M0	1	negativo	Positivo	positivo	IB***
T2	N1	M0	2	positivo	Positivo	positivo	IB***
T0-2	N2	M0	1-2	positivo	Positivo	positivo	IB***
T3	N1-2	M0	1	positivo	Positivo	positivo	IB***
T3	N1-2	M0	2	positivo	Positivo	positivo	IB***

T1	N0	M0	1	negativo	Negativo	negativo	IIA***
T1	N0	M0	2	negativo	Negativo	negativo	IIA***
T1	N0	M0	3	negativo	Positivo	negativo	IIA***
T1	N0	M0	3	negativo	Negativo	positivo	IIA***
T1	N0	M0	3	negativo	Negativo	negativo	IIA***
T0-1	N1mi	M0	1	negativo	Negativo	negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	2	negativo	Negativo	negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	3	negativo	Positivo	negativo	IIA
T0-1	N1mi	M0	3	negativo	Negativo	positivo	IIA
T0-1	N1mi	M0	3	negativo	Negativo	negativo	IIA
T0-1	N1	M0	1	positivo	Positivo	negativo	IIA
T0-1	N1	M0	1-2	positivo	Negativo	qualquer	IIA
T0-1	N1	M0	1	negativo	Positivo	negativo	IIA
T0-1	N1	M0	1	negativo	Negativo	positivo	IIA
T0-1	N1	M0	3	negativo	Positivo	positivo	IIA
T2	N0	M0	1	positivo	Positivo	negativo	IIA
T2	N0	M0	1-2	positivo	Negativo	qualquer	IIA
T2	N0	M0	1	negativo	Positivo	negativo	IIA
T2	N0	M0	1	negativo	Negativo	positivo	IIA
T2	N0	M0	3	negativo	Positivo	positivo	IIA
T0-2	N2	M0	1	negativo	positivo	positivo	IIA***
T3	N1-2	M0	1	negativo	positivo	positivo	IIA
T0-1	N1	M0	1	negativo	negativo	negativo	IIB
T0-1	N1	M0	2	positivo	positivo	negativo	IIB
T0-1	N1	M0	2	negativo	positivo	negativo	IIB
T0-1	N1	M0	2	negativo	negativo	positivo	IIB
T0-1	N1	M0	3	positivo	positivo	negativo	IIB

T0-1	N1	M0	3	positivo	negativo	qualquer	IIB
<p>T: tamanho tumoral</p> <p>N: status dos linfonodos</p> <p>M: status de metástases à distância</p> <p>RE: receptor de estrogênio</p> <p>RP: receptor de progesterona</p> <p>HER2: receptor para fator de crescimento epidérmico humano 2</p> <p>* Para casos de HER2 equívoco por FISH ou CISH (de acordo com diretrizes de 2013 da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e do Colégio Americano de Patologia), a categoria “HER2-negativo” deve ser utilizada;</p> <p>** Escore de recorrência do Oncotype DX® abaixo de 11;</p> <p>*** Denota um grupo de estadiamento para o qual o uso do grau ou dos fatores prognósticos levou à modificação para mais de 1 grupo de estadiamento (por exemplo, do Grupo de Estadiamento Anatômico IIB para o Grupo de Estadiamento Prognóstico IB).</p>							

Fonte: Hortobagyi GH, Connolly JL, D'Orsi CJ et al. Breast. In AJCC Cancer Staging Manual, 8th Edition. Chicago, Springer, p.589-628.

ANEXO B – FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO E/OU ENSINO

PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS

**USO EXCLUSIVO DA
COMISSÃO
PROTOCOLO Nº
RECEBIDO EM:
____/____/____**

No campo “fármaco”, deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

Lista das DCBs disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/dcb/lista_dcb_2007.pdf .

1. FINALIDADE

Ensino	<input type="checkbox"/>
Pesquisa	<input checked="" type="checkbox"/>
Treinamento	<input type="checkbox"/>

Início: 01/09/14

Término: 01/12/16

2. TÍTULO DO PROJETO/AULA PRÁTICA/TREINAMENTO

Análise proteômica de um novo marcador do linfonodo sentinela autólogo do sangue em pacientes com Câncer de Mama.

Área do conhecimento: Biotecnologia em saúde

3. RESPONSÁVEL

Nome completo	Bruno Anderson Matias Rocha
Instituição	Universidade Federal do Ceará

Unidade	Campus do Pici
Departamento / Disciplina	Bioquímica

Experiência Prévia:

Não	<input checked="" type="checkbox"/>
Sim	<input type="checkbox"/>

Quanto tempo?

Treinamento:

Não	<input checked="" type="checkbox"/>
Sim	<input type="checkbox"/>

Quanto tempo?

Vínculo com a Instituição:

Docente/Pesquisador	<input checked="" type="checkbox"/>
Téc. Nível Sup.	<input type="checkbox"/>
Jovem pesquisador/Pesquisador visitante	<input type="checkbox"/>

Telefone	085 988767008
E-mail	brunoanderson@gmail.com

4. COLABORADORES

Nome completo	Luiz Gonzaga Porto Pinheiro
Instituição	Universidade Federal do Ceará
Nível acadêmico	PhD
Experiência prévia (anos)	30 anos

Treinamento (especificar)	Médico cirurgião oncológico
Telefone	085999816707
E-mail	luizgporto@uol.com.br

Utilize esta tabela para o preenchimento de um colaborador. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os colaboradores sejam contemplados.

5. RESUMO DO PROJETO/AULA

O câncer possui etiopatogenia complexa e multifuncional, não podendo ser prevenido. Desta forma, os esforços para melhoria dos números relacionados ao câncer de mama são direcionados para antecipação do diagnóstico, tendo como consequência: diminuição da agressividade do tratamento administrativo e redução da taxa de mortalidade. A biópsia do linfonodo sentinela (LS) no tratamento cirúrgico do câncer de mama com estadiamento inicial vem sendo atualmente empregada como parte do protocolo de rotina, evitando na maioria dos casos, a linfadenectomia total. Para se tornar possível a biópsia do LS é necessária a utilização de marcadores que identifiquem o LS e facilite o ato cirúrgico. Entre os marcadores mais utilizados, estão: tecnécio e o azul patente. Os resultados das pesquisas de linfonodos sentinelas são animadores, porém, o uso dos seus marcadores possui desvantagens, como por exemplo, o alto custo do tecnécio e as reações alérgicas causadas por azul patente.

Durante o exame físico de duas pacientes submetidas a biópsia de mama, foi observado na pele das mesmas, o mapeamento dos vasos linfáticos com uma coloração avermelhada, em direção ao linfonodo axilar. Estudos prévios lançaram a teoria que um derivado de sangue (hemossiderina) foi capturado por macrófagos e acessado no ducto linfático em direção à axila.

Na tentativa de replicar o que foi visto em pacientes, foi desenvolvido um protocolo experimental para a obtenção de um marcador derivado do sangue e testado em um modelo de cirurgia experimental em cães onde afirmou-se a existência de um novo marcador autólogo do sangue. Após vários estudos, já se encontram sendo realizadas aplicações em pacientes com câncer de mama no Hospital Maternidade

de Fortaleza. Sendo reconhecido o sucesso em todos os procedimentos de aplicação de “hemossiderina”. Porém, a hipótese de que o marcador derivado do sangue seria a hemossiderina surgiu somente de dados clínicos e pesquisas científicas preliminares, assim, a afirmação possui os seus vieses. Os estudos proteômicos levariam ao desembaraço destes vieses, assim, o projeto possui como principais objetivos a caracterização da distribuição geral de proteínas das hemácias após a hemólise, identificação e caracterização das proteínas individuais de interesse e principalmente elucidar suas associações e funções do marcador em questão. Para isso será utilizada a seguinte estratégia experimental: Coleta e preparo da amostra bruta já utilizada na marcação do LS em pacientes; para posterior isolamento e purificação das moléculas através de estudos proteômicos, paralelamente com estudo experimental em animais e finalmente, a aplicação do marcador isolado em pacientes com CA de mama. Visando obter como resultado a caracterização da(s) substância(s) autóloga(s) do sangue capazes de marcar o LS que poderá(ão) ser utilizada(as) como produto biotecnológico como novo marcador do LS, podendo vir a substituir outros produtos que já são utilizados no mercado, podendo até ser produzidos em grande escala.

6. OBJETIVOS (na íntegra)

Objetivo geral

Identificar as proteínas presentes nas amostras coletadas em indivíduos saudáveis ou com CM e que sejam capazes de realizar a marcação tecidual do linfonodo sentinela.

Objetivos específicos

Avaliar, como forma de triagem, as melhores metodologias de purificação empregadas por meio da injeção das frações purificadas na face plantar do membro posterior esquerdo dos ratos, usando como controle o azul-patente no membro contralateral. Assim, serão possíveis a avaliação da eficácia das frações purificadas na marcação e quais metodologias deverão ser realizadas com maior acurácia:

1. Identificando e/ou a quantificando as proteínas presentes no concentrado de hemácias após hemólise capazes de atuar como corante tecidual do linfonodo sentinela;

2. Determinando a concentração de metahemoglobina ideal para marcação tecidual;
3. Avaliando quais frações proteicas predominantes nas amostras de sangue purificadas por cromatografias são capazes de atuar como marcador tecidual;
4. Identificando as proteínas separadas através de espectrometria de massas sequencial capazes de marcar o LS;
5. Realizando os procedimentos de marcação de linfonodo sentinela com as frações separadas por cromatografia;

7. JUSTIFICATIVA

Câncer de Mama

No organismo normal o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas. No entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, são células com o DNA danificado e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular. O “câncer” surge de uma única célula que sofreu mutação, multiplicou-se por mitoses e suas descendentes foram acumulando outras mutações até darem origem a uma célula cancerosa. Portanto, a incidência destes tumores se caracteriza pela proliferação celular anormal, cuja denominação correta é neoplasia.

Os fatores de risco para uma neoplasia de mama são condições que aumentam o risco de ter câncer: idade, fatores hormonais, herança genética, hábitos de vida, fatores alimentares, composição corporal, histórico de algumas doenças prévias nas mamas, exposição à radiação ionizante, entre outros. Alguns desses fatores aumentam as chances de câncer de mama em até 2x (fator de risco menor) e outros aumentam o risco em mais de 2x (fator de risco maior). A distribuição desses fatores varia nas diversas populações e muitas mulheres podem ter fatores de ambos os grupos (INCA, 2011).

Nos últimos 30 anos, têm ocorrido no Brasil e no mundo várias transformações sociais e econômicas em consequência do constante crescimento urbano e industrial. Um perfil demográfico e epidemiológico vem se renovando ao longo dos tempos por causa da redução das taxas de mortalidade causadas por

doenças infecciosas e dos aumentos acentuados da expectativa de vida da população, da incidência da morbidade e da mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis, destacando-se, entre estas, as neoplasias (Bray et al.,2004).

As neoplasias são consideradas um grande problema de Saúde Pública, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, pela sua magnitude, capacidade de causar elevado índice de morbimortalidade, e pelo elevado custo no tratamento. Para o sexo feminino, destacam-se os cânceres de mama (CM) e de colo do útero. O câncer de mama é o segundo mais comum no mundo e o primeiro entre as mulheres (cerca de um milhão de casos novos por ano), mais da metade de casos novos ocorrendo em países desenvolvidos (INCA, 2007). Segundo a American Cancer Society, cerca de 230 mil novos casos de carcinoma mamário invasor foram previstos para o ano de 2011 nos Estados Unidos, assim como cerca de 39 mil óbitos decorrentes da doença (DeSantis et al.,2011). De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa é que em 2012 sejam diagnosticados no Brasil 52.680 novos casos de câncer de mama (INCA, 2012).

A incidência do câncer de mama no Brasil possui considerável significância, tendo aproximadamente 50 mil casos novos por ano. Este padrão de ocorrência apresenta variações regionais importantes no país, com taxas de incidência mais elevadas nas regiões Sul e Sudeste, ao mesmo tempo em que as menores incidências são verificadas na Região Norte. O CM também possui valor significativo dentre as taxas de mortalidade, sendo o líder com 11 mil mortes de mulheres, registrado até 2007. Este crescimento se torna evidente a partir do final da década de 70, onde o CM assume a posição de principal causa de morte por câncer em mulheres, no Brasil (15,5%), acompanhando o padrão mundial (INCA, 2002). O maior número de mortes se concentra, principalmente, em áreas onde a incidência é elevada e os recursos médicos para um diagnóstico precoce e tratamento adequado são de difícil acesso ou mesmo inexistentes (Smith, 2006).

Embora as neoplasias malignas sejam a segunda causa de morte no país, as estratégias para seu controle enfrentam problemas que afetam desde os mecanismos de formulação de políticas, até a mobilização da sociedade, incluindo a organização e o desenvolvimento das ações e serviços e as atividades de ensino e pesquisa. Dois aspectos caracterizam o câncer como um problema de saúde

pública no Brasil. Primeiro, o aumento gradativo da incidência e mortalidade por câncer, proporcionalmente ao crescimento demográfico, o envelhecimento populacional e ao desenvolvimento socioeconômico. Segundo, o desafio que isso representa para o sistema de saúde no sentido de garantir-se o acesso pleno e equilibrado da população ao diagnóstico e tratamento dessa doença (Oliveira et al., 2011).

Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama

O câncer possui etiopatogenia complexa e multifuncional, não podendo ser prevenido. Desta forma, os esforços para melhoria dos números relacionados ao câncer de mama são direcionados para antecipação do diagnóstico, tendo como consequência: diminuição da agressividade do tratamento administrativo e redução da taxa de mortalidade (Molina et al., 2003).

Quando comparadas de acordo com estadiamento das neoplasias malignas, as mulheres brasileiras são diagnosticadas em estádios III e IV, enquanto que países desenvolvidos as mulheres recebem o diagnóstico do CM em estádios I e II (Paulinelli et al., 2003).

A busca por maior sensibilidade e especificidade, a detecção de tumores no início do CM, incentivou a realização de estudos que obtiveram consequências efetivas em estratégias que pautassem os programas de detecção precoce do CM (Menke et al., 2007). Estes programas de detecção do CM possuem como principal objetivo a diminuição da morbi-mortalidade causadas pela doença, além do favorecimento do diagnóstico precoce (Feig, 2006).

O rastreamento e detecção precoce do CM, se apoia principalmente na tríade:

1. Auto- exame das mamas (AEM): Apresenta baixo custo, alta acessibilidade, mas requer dedicação e treinamento da mulher, para aumentar sua baixa eficácia.
2. Exame clínico das mamas (ECM): Apresenta custo baixo a moderado, nem sempre é acessível e sua eficácia é moderada.
3. Mamografia: É considerada um método mais eficaz na detecção de tumores iniciais da mama, mas possui custo mais elevado (Aguillar et al., 2003).

Entre os métodos de detecção do CM mais utilizados, mamografia é a que apresenta maior eficácia na detecção de tumores em estádios iniciais. Está bem estabelecido que o CM quando detectado durante o rastreamento mamográfico, apresenta menor estadiamento clínico, ou seja, são tumores menores, que apresentam menor disseminação em linfonodos axiliares e possibilitam a realização de cirurgias conservadoras sem a necessidade de tratamento de alta toxicidade como a quimioterapia (Capgar et al., 2007).

No âmbito das especialidades oncológicas, o tratamento do câncer de mama inicia-se pela avaliação do tamanho da lesão, da margem de ressecção (se acometida, ou não) e da variedade histopatológica do tumor (carcinoma dos tipos comedo e não comedo). Deve-se valorizar, também, as características da imagem mamográfica e as condições da paciente, inclusive o seu acesso ao tratamento, bem como a sua vontade de preservar a mama (INCA, 2001). As modalidades terapêuticas disponíveis atualmente são a cirúrgica e a radioterápica para o tratamento loco-regional e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico.

A indicação de diferentes tipos de cirurgia depende do estadiamento clínico e do tipo histológico, podendo ser conservadora ressecção de um segmento da mama (engloba a setorectomia, a tumorectomia alargada e a quadrantectomia), com retirada dos gânglios axilares ou linfonodo sentinela, ou não-conservadora (mastectomia). Nas mulheres com tumor de diâmetro igual ou inferior a três centímetros, sem comprometimento nodal clinicamente aparente, pode ser utilizada, quando disponível, a técnica do linfonodo sentinela (LS) que visa identificar aquelas que necessitam ser submetidas à linfadenectomia axilar. O exame citológico ou histológico do LS é realizado pelo patologista para identificar ou descartar a presença de metástases. Esta técnica deve ser realizada por equipe multidisciplinar treinada (mastologista, patologista e médico nuclear). A cirurgia conservadora preenche os pré-requisitos que norteiam o tratamento cirúrgico do câncer de mama, que são: máximo controle loco-regional, estadiamento, prognóstico semelhante com menor morbidade e mutilação (INCA,2004).

Linfonodo Sentinela

Linfonodos são pequenos órgãos compostos por tecido linfóide que se encontram espalhados pelo corpo, sempre no trajeto de vasos linfáticos. Eles atuam como filtro da linfa, antes da mesma retornar ao sangue. Cada grupamento linfonodal é responsável pela drenagem de determinada parte do corpo, por exemplo, os linfonodos axilares recebem tanto a linfa da mama quanto do braço. Após a invasão local do estroma circunjacente, as células malignas penetram nos vasos linfáticos, crescendo nos locais invadidos e desprendem-se isoladamente ou agregadas. O transporte destas células é realizado pelo sistema linfático, chegando aos gânglios linfáticos, proliferam-se, passando para outros gânglios vizinhos e penetrando na circulação sistêmica (Nicolson; Fidler, 1993).

O linfonodo sentinela (LS) é definido como o primeiro a receber a drenagem linfática de um tumor, ou seja, em neoplasias que as metástases ocorrem principalmente por via linfática, ele provavelmente será o primeiro local de disseminação. Hoje, a utilização da técnica do LS em oncologia vem crescendo rapidamente em várias neoplasias. A técnica da pesquisa do LS caracteriza-se principalmente em poder prever com um alto percentual de acerto quais são as características dos demais linfonodos regionais, caracterizando-se como uma excelente maneira de estadiar estes tumores. Em nenhuma das neoplasias estudadas o LS apresentou modificações dos prognósticos, mas foi possível estadiar melhor estes pacientes e poupar as linfadenectomias regionais, as quais são fatores de morbidade e mortalidade pós-operatórias (Boff, 2005).

A metástase no LS só apresenta confirmação após a biópsia do linfonodo sentinela, técnica considerada padrão ouro na área cirúrgica do câncer de mama (Pereira et al., 2008). A biópsia do LS é um método seletivo, minimamente invasivo e altamente sensível na identificação de metástases. Se o exame histopatológico do LS evidenciar negatividade no comprometimento tumoral, o restante dos linfonodos do mesmo local possui cerca de 1 a 2% de probabilidade de conter células neoplásicas. Ele era o único linfonodo acometido em mais de 40% dos casos (Paz et al., 2001). Entretanto, a presença de metástase para o LS poderá indicar a necessidade do esvaziamento da cadeia linfática mamária e um indicador de doença mais avançada (Urban et al., 2001).

Métodos de Identificação do LS

A biópsia do linfonodo sentinela no tratamento cirúrgico do câncer de mama com estadiamento inicial vem sendo atualmente empregada como parte do protocolo de rotina, evitando na maioria dos casos, a linfadenectomia total. Por ser um procedimento extremamente invasivo, a linfadenectomia possui vários efeitos adversos: dor, parestesia, grau de impotência funcional, seroma e linfedema, com sensível comprometimento da qualidade de vida das pacientes (Quadros et al., 2007).

Para se tornar possível a biópsia do LS e conseqüentemente evitar a linfadenectomia, é necessária a utilização de marcadores que identifiquem o LS e facilite o ato cirúrgico. Entre os marcadores mais utilizados, estão:

I. *Uso do Tecnécio-99*

Um radiofármaco é uma substância que, por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade de radiação, pode ser utilizada no diagnóstico e tratamento de doenças, qualquer que seja a via de administração utilizada. De forma mais simples, podemos dizer que radiofármacos são moléculas ligadas a elementos radioativos, constituindo fármacos radioativos que são utilizados em uma especialidade médica denominada Medicina Nuclear. Os radiofármacos são utilizados em quantidades traços (traçadores radioativos) com a finalidade de diagnosticar patologias e disfunções do organismo. Quando a finalidade é diagnosticar patologias, como o infarto do miocárdio ou um câncer (de mama, por exemplo), utiliza-se na composição dos radiofármacos emissores de radiação gama. A radiação gama é uma onda eletromagnética e, portanto, apresenta grande penetrabilidade nos tecidos e baixo poder de ionização quando comparada às radiações particuladas. O menor poder de ionização da radiação gama minimiza a dose de radiação absorvida pelo paciente. Radionuclídeos emissores de radiação gama, tais como o tecnécio-99, iodo-123, índio-111, galio-67 e o tálio- 201, entre outros, são utilizados na composição de radiofármacos para diagnóstico. O tecnécio-99 é o radioisótopo que reúne as melhores características físicas para a obtenção de imagens em câmaras Anger (câmaras de cintilação). Pode estar prontamente disponível, de forma conveniente, através de um gerador de molibdênio-99 a um custo reduzido, tem meia-vida física de apenas 6 horas, e a emissão energética predominante no seu processo de decaimento é de 140 keV (88%). Eluído do gerador sob a forma de pertecnetato-Tc 99m, a sua utilização

direta restringe-se aos estudos de primeira passagem, uma vez que, administrado por via venosa, rapidamente se difunde através das membranas capilares para o espaço intersticial. Entretanto, o pertecnetato-Tc 99m pode ser utilizado para marcar uma grande variedade de moléculas com o objetivo de obter imagens das mais diversas estruturas ou órgãos, o que lhe confere um papel de destaque na medicina nuclear. A desvantagem deste marcador é o custo, que é muito elevado, a radioatividade e a dificuldade de mobilizar vários profissionais (mastologista, patologista e médico nuclear). Além desses fatores não favoráveis, a disponibilidade na rotina clínica também é baixa (Araújo *et al.*, 2005).

II. *Uso do corante Azul Patente*

É uma técnica muito utilizada para identificação do linfonodo sentinela, e, geralmente, é associada à marcação de radiofármacos. A escolha da técnica para a pesquisa do linfonodo sentinela (LS) depende principalmente dos recursos da equipe. A técnica do corante é tão eficiente quanto a radioguiada e os únicos recursos necessários são uma ampola do corante e o conhecimento da técnica cirúrgica, o que torna o método muito mais viável economicamente. A identificação do linfonodo sentinela atualmente é o procedimento que apresenta o melhor valor preditivo negativo para metástase axilar, embora outros fatores preditivos também sejam importantes nas decisões sobre a conduta em diversos casos (Galeb *et al.*, 2002). A utilização de métodos anátomo-funcionais, utilizando azul patente injetado no sítio tumoral, demonstrou que havia de fato a possibilidade de identificar uma via preferencial linfática para drenagem de células melanomatosas para um linfonodo específico (sentinela). Apesar de tais vantagens deste corante, relatam-se casos de reações anafiláticas severas após injeção intradérmica do corante azul patente, apresentando risco de desencadear reações anafilactóides (Shinzato *et al.*, 2006).

Marcador Autólogo do Sangue

Os resultados das pesquisas de linfonodos sentinelas são animadores, porém, o uso dos seus marcadores possui desvantagens, como por exemplo, o alto custo do tecnécio e as reações alérgicas causadas por azul patente.

Durante o exame físico de duas pacientes submetidas a biópsia de mama, foi observado na pele das mesmas, o mapeamento dos vasos linfáticos com uma

coloração avermelha, em direção ao linfonodo axilar (Figura 1) (Pinheiro et al., 2009).



Figura 1. Mapeado da pele, como um ducto linfático em direção à axila.

Pinheiro (2009) lança a teoria que algum derivado de sangue (hemossiderina) foi capturado por macrófagos e acessada no ducto linfático em direção à axila.

Na tentativa de replicar o que foi visto em pacientes, foi desenvolvido um protocolo experimental para a obtenção de um marcador derivado do sangue (Protocolo CEP No.073.07.10) e testado em um modelo de cirurgia experimental em cães. Baseando-se na pesquisa de um modelo animal já estudado, onde o mesmo estudou o linfonodo sentinela da mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc 99mm (Pinheiro et al., 2003) (Figura 2).



Figura 2. Linfonodos sentinelas marcados com hemossiderina à esquerda e com azul patente no direito. Linfonodo sentinela não marcado no meio.

PROTOCOLO PARA UTILIZAÇÃO DO MARCADOR AUTÓLOGO DO SANGUE

Com o objetivo de avaliar a utilização do derivado do sangue (hemossiderina) no mapeamento do linfonodo sentinela na mamária das cadelas, foram realizados experimentos preliminares em 6 cadelas, sendo encontrados dados estatisticamente significativos e consistentes quando comparados o grupo que foi marcado com azul patente / tecnécio versus o grupo submetido ao marcador autólogo derivado do sangue / tecnécio. Os resultados do trabalho experimental mostraram que a “hemossiderina” foi capaz de ser usada junto ao radiofármaco (tecnécio 99m) e a coloração foi extremamente efetiva no linfonodo sentinela das cadelas.

Com a comprovação que o uso da “hemossiderina” com o radiofármaco apresentava resultado efetivo na identificação dos linfonodos sentinelas mamários da cadela, sendo sempre encontrados em ambas as axilas, podemos afirmar a existência de um novo marcador autólogo do sangue. Tendo em vista o que foi descrito, começara uma nova linha de pesquisa para marcador do LS, onde o marcador em questão apresentara como principais vantagens: não causar efeitos secundários como reações alérgicas, diminuição das despesas pessoais e de

saúde, redução a morbidade do procedimento e do sofrimento emocional, juntamente com outras vantagens indiretas (Pinheiro et al., 2009; Pinheiro et al., 2010).

Logo após a descoberta do novo marcador do LS, observou-se que durante o experimento o animal era sacrificado e o manuseio do sangue dispensava medidas que evitassem a contaminação do derivado sanguíneo. Na perspectiva da utilização experimental do método em humanos, como substituto do Azul Patente, sentiu-se a necessidade de desenvolver uma técnica asséptica de manipular o sangue desde a colheita em veia periférica, no processo de hemólise até a injeção no espaço subareolar, com o objetivo de prevenir infecção da paciente. Onde os experimentos revelaram que após a coleta e preparo de 18 amostras, sendo 6 cadelas e 12 voluntários (Protocolo CEP No.073.07.10), somente as 3 amostras de sangue total apresentaram contaminações na coleta e 3 amostras de concentrado de “hemossiderina” após o processo de preparação apresentaram contaminação. Estas contaminações nos levaram a crer que os principais pontos críticos seriam a coleta e o estado de saúde das mesmas, então fora reformulado todo o processo, desde a coleta até a manipulação, em 12 amostras de humanos na coleta e após manipulação, não havendo presença de contaminantes em nenhuma das amostras. Assim, o estudo comprovou que a solução de “hemossiderina” pode ser obtida sem contaminação durante sua preparação pelo método descrito (Alves et al., 2010).

Paralelamente, com os estudos de obtenção da amostra asséptica, no Departamento de Física da Universidade do Ceará eram realizados testes nas amostras do concentrado de “hemossiderina”. Tendo em vista que a molécula de hemoglobina das hemácias possui Ferro e após a hemólise este Ferro é captado por macrófagos, foram realizados testes que comprovassem a teoria que a hemólise das hemácias causava aumento da concentração de hemossiderina e conseqüentemente o aumento da concentração de nanopartículas de Ferro na amostra. A análise dos cortes dos linfonodos marcados e do esfregaço do próprio marcador via AFM em condições ambientais não revelaram a presença de nanopartículas, mas sim de cristais do tipo agulha. A composição desses cristais foi investigada através da técnica de difração de raios x, onde se constatou a presença de uma fase que não possuía propriedades magnéticas. Os resultados

foram satisfatórios no tocante ao enriquecimento de ferro do novo marcador. Apesar disso, o marcador, que se mostrou extramamente satisfatório na linfocintilografia e no ultrassom da mama das pacientes, apresentou contraste magnético na análise de Ressonância Magnética Nuclear.

Na área de Medicina Nuclear foram realizadas medidas quantitativas de intensidade de sinal em linfonodos da região axilar destas pacientes examinadas através do método. Os resultados obtidos mostram uma maior intensidade de sinal nestes linfonodos, quando comparados com regiões teciduais adjacentes aos mesmos ou em relação aos linfonodos contralaterais, em áreas que não receberam injeção do hemoconcentrado (Figura 1). Sabe-se que no caso de hematomas em evolução, o ferro sofre alterações na quelação e nos estados de spin dos elétrons, assim como na geometria molecular e na compartimentalização, que se manifestam por alterações características à imagem por ressonância magnética (RM). De fato, a evolução ordenada dos estados do ferro dos hematomas à RM, afetada até certo ponto por considerações locais de pH e PO_2 , possibilita que os hematomas sejam classificados como em estágio agudo, subagudo e crônico. O ferro da oxihemoglobina está no estado ferroso (Fe^{+2}), mas não apresenta elétrons pareados e é, portanto, diamagnético. Alguns minutos a algumas horas podem transcorrer antes da oxihemoglobina ser dessaturada a desoxihemoglobina. Embora ainda contenha Fe^{+2} , a desoxihemoglobina tem 4 elétrons não pareados. Devido à geometria molecular, os elétrons não pareados não podem chegar suficientemente próximo dos prótons de água para que ocorram interações próton-elétron, dipolo-dipolo. Durante uma hipóxia continuada, há nas hemácias a oxidação irreversível da desoxihemoglobina a metahemoglobina. A metahemoglobina tem 5 elétrons não pareados e, devido a sua geometria, possibilita que os prótons da água se aproximem o suficiente para que ocorram interações próton-elétron, dipolo-dipolo. Tipicamente, o sinal aumentado da metahemoglobina fica na periferia do hematoma e à oxidação continuada preenche-se gradualmente com o tempo. A formação da metahemoglobina geralmente inicia-se entre 72 e 90 horas. Isto aparece como um sinal intenso nas imagens ponderadas em T1. A proposta inicial da pesquisa através de imagens de ressonância magnética compreende o estudo de cerca de 30 casos. No entanto, até o momento, examinamos cerca de um terço destas pacientes. Portanto,

devemos considerar a baixa amostragem até o momento, além de alguns fatores limitantes pertinentes a metodologia (sinal das bobinas utilizadas, campo magnético do equipamento e a definição do tempo necessário para degradação da hemoglobina até metahemoglobina), ainda sob análise e discussão.

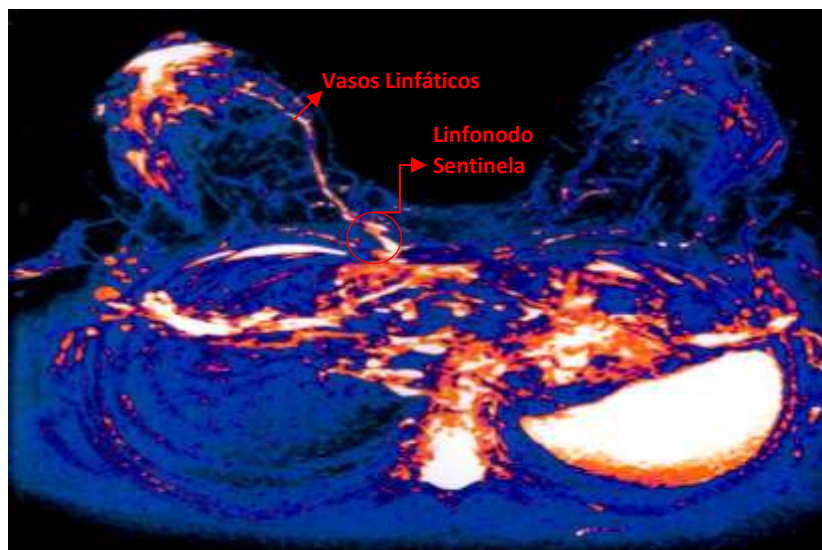


Figura 1. Algumas horas após injeção prévia do concentrado autólogo de hemácias hemolisadas, foram adquiridas imagens axiais ponderadas em T1 através de equipamento de ressonância magnética 1,5 Tesla, evidenciando tórax, mamas e sistema linfático regional.

Na busca de isolarmos o novo marcador, que teoricamente seria a hemossiderina, foram feitos testes cromatográficos utilizando exclusão molecular para separar as proteínas presentes no sangue e visualizá-las por eletroforese. Os padrões eletroforéticos eram característicos aqueles encontrados na hemossiderina caracterizada por outros trabalhos, onde foi observado um alto teor de ferritina em diversos estágios de degradação lisossomal.

Após todos os estudos citados anteriormente, já se encontram sendo realizadas aplicações em pacientes com CA de mama no Hospital Maternidade de Fortaleza. Sendo reconhecido o sucesso em todos os procedimentos de aplicação de “hemossiderina”.

Baseado em dados clínicos e pesquisas científicas surgiu a hipótese de que o marcador derivado do sangue seria a hemossiderina, mas mesmo com todas estas pesquisas citadas anteriormente a afirmação possui os seus vieses. Os estudos proteômicos levariam ao desembaraço destes vieses, caracterizando a

distribuição geral de proteínas das hemácias após a hemólise, identificando e caracterizando proteínas individuais de interesse e principalmente elucidando as suas associações e funções do marcador em questão, podendo resultar em uma produção em larga escala e até substituição do azul patente.

Análise Proteômica

O termo proteína foi introduzido na linguagem no ano de 1938 pelo Químico sueco Jöns Jacob Berzelius para descrever um tipo particular de macromoléculas composto por uma cadeia linear de aminoácidos, e que eram abundantes em organismos vivos (Twyman, 2004). Devido a diversidade de funções, as proteínas exercem um papel fundamental em quase todos os fenômenos biológicos, como produção de energia, defesa imunológica, contração muscular, atividade neuroquímica em reprodução (De Sousa et al., 2003).

O objetivo inicial dos estudos proteômicos foi a identificação em larga escala de todas as proteínas presentes em uma célula ou tecido. Atualmente, consistem na análise simultânea de misturas complexas de proteínas como as provenientes de lisados celulares e extratos de tecidos com o intuito de detectar diferenças quantitativas e qualitativas na expressão protéica (Westermeier; Naven, 2002).

Seus objetivos se diversificaram para a análise de vários aspectos funcionais das proteínas, como modificações pós-traducionais, interações proteína-proteína, existência de isoformas, atividades e estruturas. O campo de atuação desta ciência estende-se à descoberta de novas drogas, terapias, diagnósticos, microbiologia, bioquímica. A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (Cash, 2002).

Os avanços no conhecimento de estudos proteômicos têm proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e

diferenciação celular, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais (Lamond, Mann, 1997).

Entre os principais avanços da proteômica na área da oncologia, podemos citar os marcadores tumorais. Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo o aparecimento e ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (Capelozzi, 2001). Estas substâncias funcionam como indicadores da presença de câncer, podendo ser produzidas em resposta do organismo ao tumor ou pelo próprio tumor (Silveira, 2005). Em sua grande maioria, os marcadores tumorais são proteínas ou pedaços de proteínas, incluindo antígenos de superfície celular, enzimas, hormônios e proteínas citoplasmáticas (Mattos et al., 2005).

Os principais marcadores tumorais estão: AFP (alfafetoproteína); MCA (antígeno mucóide associado ao carcinoma); Cromogranina A; BTA (antígeno tumoral da bexiga); Telomerase; NMP22 (proteína da matriz nuclear); Cyfra 21.1; PAP (Fosfatase Ácida Prostática); CA 72.4; β -HCG (gonadotrofina coriônica humana); CA 125; CA 15.3; CA 19.9; CA 27.29; CA 50; Calcitonina; Catepsina D; CEA (antígeno carcinoembrionário); *C-erbB-2* (oncogene); LDH (desidrogenase láctica); K-ras; NSE (Enolase Neurônio- Específica); PSA (antígeno prostático específico); p53 e β -2-Microglobulina (Reis, 2005; Rosa et al., 2005; Gomes, 1997).

O uso da proteômica na descoberta da substância retirado do pool de proteínas que já é utilizado experimentalmente em pacientes com CA de mama é de fundamental importância para o processo de avanço dos estudos. Onde as ferramentas cristalográficas e de espectrometria de massas possibilitam um melhor conhecimento da importância de análogos e de modificações específicas para a posterior construção da molécula. Nesse aspecto, a predição de análogos que sejam reconhecidos especificamente por sítios ativos enzimáticos encontra na modelagem molecular e nos estudos baseados em dinâmica molecular ferramentas fundamentais para esse desenvolvimento.

A associação do conhecimento cristalográfico com a modelagem molecular na criação de bibliotecas de potenciais marcadores e a análise da dinâmica molecular da interação desses compostos permitem o desenho de moléculas que apresentem uma capacidade de coloração elevada. Uma vez selecionados esses

compostos, testes farmacológicos podem confirmar sua atividade e para a viabilidade da utilização desses compostos testes de citotoxicidade e genotoxicidade são fundamentais e permitiriam uma seleção detalhada dos possíveis alvos para uma síntese posterior.

8. RELEVÂNCIA

A identificação do linfonodo sentinela atualmente é o procedimento que apresenta o melhor valor preditivo negativo para metástase axilar, embora outros fatores preditivos também sejam importantes nas decisões sobre a conduta em diversos casos (Galeb et al., 2002). A utilização de métodos anátomo-funcionais, utilizando azul patente e/ou tecnécio injetado no sítio tumoral, demonstrou que havia de fato a possibilidade de identificar uma via preferencial linfática para drenagem de células melanomatosas para um linfonodo específico (sentinela). Apesar das vantagens destes métodos, relatam-se casos de reações anafiláticas severas após injeção intradérmica do corante azul patente (Shinzato et al., 2006), além disso, o auto-custo e a difícil manipulação do tecnécio torna-o de difícil acesso para a população mais carente.

O projeto possui uma alta relevância, pois se trata da pesquisa de um novo produto biotecnológico de baixo custo, capaz de substituir marcadores de linfonodo sentinela já utilizados no mercado. Além disso, pesquisas anteriores, já aprovadas pelo Comitê de Ética Animal do estado do Ceará, em animais (cadelas) já evoluíram para testes em pacientes com câncer de mama, sendo comprovada a utilidade deste pool de proteína como marcador. Com estes resultados satisfatórios, se faz necessária a continuação de pesquisas para purificação e identificação desta proteína capaz de marcar o linfonodo sentinela.

9. MODELO ANIMAL

Espécie (nome vulgar, se existir): Rato wistar

Justificar o uso dos procedimentos e da espécie animal

Justificativa da espécie animal:

Foram realizados testes preliminares em ratos, onde não houve êxito nos testes pois, a distancia entre a mama e a axila é bastante próxima assim havia uma drenagem para “todos” os linfonodos axilares e não somente o sentinela.

Depois foram realizados testes em porcos, porem os mesmos possuem distribuição linfática de difícil acesso onde seus linfonodos são complicados de ser detectados mesmo com o auxilio do radiofarmaco (tecnécio) e a realizados por profissionais treinados (cirurgiões e veterinários), tornando o experimento em porcos inviável.

Finalmente foram realizados testes em cadelas, onde obtemos êxito em todos os experimentos realizados, obtendo marcações do linfonodo sentinela axilar. Porém, necessita de um maior número de animais ao decorrer da purificação.

Assim, com o objetivo de fazermos uma pré-triagem de qual macromolécula é capaz de ter uma coloração não seletiva, mas efetiva nos vasos linfáticos e até linfonodos, e assim usemos um menor número de cadelas, seria necessário o uso de ratas fêmeas adultas.

Pinheiro LGP. et al. **Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio Tc 99m¹**. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2003. V.18 (6): 514-517.

Oliveira RS, Paiva GR, Ferreira LM, Wagner J, Nogueira AS. **Experimental model in the rat for sentinel node biopsy. Comparision between dextran and phytate**. *Acta Cir Bras* [serial online] 2003 Vol 18 Special Edition. Available on URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Justificativa do uso do procedimento:

Pesquisas anteriores em animais e até em pacientes comprovam a marcação efetiva do linfonodo sentinela, assim, para que continuemos a pesquisa para purificação e isolamento desta proteína capaz de marcar o mesmo, é necessária a realização de ensaios in vivo em paralelo para confirmação das nossas teorias.

9.1. PROCEDÊNCIA

Biotério, fazenda, aviário, etc.	Biotério (farmacologia)
-------------------------------------	-------------------------

Animal
silvestre

Número de protocolo SISBIO: _____

Outra
procedência?

Qual? _____

O animal é geneticamente
modificado?

Número de protocolo CTNBio: _____

9.2. TIPO E CARACTERÍSTICA

Espécie	Linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				M	F	M+F
Anfíbio						
Ave						
Bovino						
Bubalino						
Cão						
Camundongo heterogênico						
Camundongo isogênico						
Camundongo <i>Knockout</i>						
Camundongo transgênico						
Caprino						
Chinchila						
Cobaia						
Coelhos						
Equídeo						
Espécie silvestre brasileira						
Espécie silvestre não-						
Gato						
Gerbil						
Hamster						

Ovino						
Peixe						
Primata não-humano						
Rato heterogênico	Swins	Adulto	600g		70	
Rato isogênico						
Rato <i>Knockout</i>						
Rato transgênico						
Réptil						
Suíno						
Outra						
					TOTAL:	50

9.3. MÉTODOS DE CAPTURA (somente em caso de uso de animais silvestres)

--

9.4. PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO/DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da nossa universidade (UFC), o estudo experimental será cirúrgico prospectivo. Ele terá lugar no laboratório de cirurgia experimental Prof Saul Goldenberg, a fim de avaliar a utilização das substâncias derivadas da hemólise das hemácias. Serão utilizadas aproximadamente 5 animais para cada substância isolada após purificação. Aproximadamente 50 ratas fêmeas, com 600 mg de peso médio, serão cedidas pelo biotério da Farmacologia-UFC para serem estudadas.

Após coleta de sangue total doado pelo HEMOCE, faremos a lavagem e hemólise apropriada das hemácias. Em seguida, avaliaremos a utilização das substâncias derivadas da hemólise das hemácias isoladas após estudo proteômico, no mapeamento e na identificação do linfonodo sentinela através da aplicação do hemoderivado e das suas frações após purificação, nas patas posteriores de ratos fêmeas e adultas. Os animais deverão ser pesados e após a imobilização apropriada serão anestesiados com uma aplicação por via intraperitoneal de Quetamina (peso/100 em ml) e Xilazina (peso/100 em ml) imediatamente antes da experiência. Posteriormente, serão realizadas incisões em ambas as patas posteriores e região inguinal para observação da coloração do linfonodo sentinela, onde em uma pata será injetada o azul patente para o controle positivo e em outra pata a amostra a ser estudada que é identificada pela sua cor. Quando a cirurgia terminar, a eutanásia do animal será realizada por deslocamento cervical.

Após o procedimento no animal, a drenagem pelos vasos linfáticos e o linfonodo sentinela serão avaliados pela sua cor e os linfonodos corados serão retirados para avaliação pelo método de Peerls . Assim, será possível realizar uma triagem de qual(is) substância(s) é(são) responsável(eis) pela coloração efetiva dos vasos linfáticos e conseqüentemente dos linfonodos.

9.5. GRAU DE INVASIVIDADE*: 2 (1, 2, 3 ou 4)

Os materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos? Quais?
Se já aprovado pela CEUA, mencionar o número do protocolo.

9.6. CONDIÇÕES DE ALOJAMENTO E ALIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS

- Alimentação (ração apropriada)
- Fonte de água (reservatório próprio para gaiolas)
- Lotação - Número de animais/área (5 animais por gaiola)
- Exaustão do ar: não

Comentar obrigatoriamente sobre os itens acima e as demais condições que forem particulares à espécie

Os animais chegarão com 2 horas de antecedência, do biotério do departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Ceara, alimentados e aproximadamente 5 por gaiola. Serão submetidos a anestesia e posteriormente a cirurgia, em local devidamente apropriado. Onde a cirurgia será realizada com uma equipe multiprofissional (médico cirurgião, farmacêutica e estudantes). Após o procedimento, os animais serão levados ao biotério devidamente eutanasiados.

O laboratório experimental Saul Gudenberg é composto fisicamente por um conjunto de dois laboratórios, totalizando uma área de aproximadamente 100 m², que abriga divisões para o avanço de todas as linhas de pesquisa do grupo de pesquisa do linfonodo sentinela. Nestes laboratórios, desenvolvem pesquisas estudantes de iniciação científica, mestrado, doutorado, além dos docentes da UFC que fazem parte do grupo, totalizando aproximadamente 40 pessoas. O laboratório de Bioquímica conta com balança, microscópios, centrífuga, estufa, etc. O laboratório de Cirurgia Experimental possui todos os equipamentos necessários para execução de procedimentos cirúrgicos em animais.

Local onde será mantido o animal: _____biotério_____ (biotério, fazenda, aviário, etc.).

Ambiente de alojamento:

Gaiola	<input checked="" type="checkbox"/>
Jaula	<input type="checkbox"/>
Baia	<input type="checkbox"/>
Outros	<input type="checkbox"/>

Número de animais por gaiola/galpão: 5

Tipo de cama (maravalha, estrado ou outro): _____

10. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO PROJETO/AULA

10.1. ESTRESSE/DOR INTENCIONAL NOS ANIMAIS

Curto	<input type="checkbox"/>	Não	<input checked="" type="checkbox"/>
Longo	<input type="checkbox"/>	Sim	<input type="checkbox"/>

(Se "sim", JUSTIFIQUE.)

ESTRESSE:

DOR:

RESTRIÇÃO HÍDRICA/ALIMENTAR:

OUTROS:

10.2. USO DE FÁRMACOS ANESTÉSICOS

Sim	<input checked="" type="checkbox"/>
Não	<input type="checkbox"/>

Fármaco	Xilazina
Dose (UI ou mg/kg)	90mg/kg
Via de administração	via intraperitoneal

Fármaco	cetamina
Dose (UI ou mg/kg)	12mg/kg
Via de administração	via intraperitoneal

(Em caso de não-uso, JUSTIFIQUE.)

10.3. USO DE RELAXANTE MUSCULAR

Sim

Não

Fármaco	Xilazina
Dose (UI ou mg/kg)	90mg/kg
Via de administração	via intraperitoneal

Fármaco	Cetamina
Dose (UI ou mg/kg)	12mg/kg
Via de administração	via intraperitoneal

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.4. USO DE FÁRMACOS ANALGÉSICOS

Sim

Não

Justifique em caso negativo:

Na cirurgia, o animal estará anestesiado tomando-se todas as providencias para o mesmo não vir a sentir nenhuma dor no procedimento. Após o termino do experimento, o animal sofrerá eutanásia.

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	
Frequência	

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

No campo "fármaco", deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.5. IMOBILIZAÇÃO DO ANIMAL

Sim

Não

Indique o tipo em caso positivo:

No ato cirúrgico, atadura nas patas.

10.6. CONDIÇÕES ALIMENTARES

JEJUM:

Sim

Não

Duração em horas: _____

Restrição Hídrica:

Sim
 Não

Duração em horas: _____

10.7. CIRURGIA

Sim
 Não

Única
 Múltipla

Qual(is)?

Incisão em ambas as patas posteriores.

No mesmo ato cirúrgico ou em atos diferentes? Mesmo ato cirúrgico

10.8. PÓS-OPERATÓRIO

10.8.1. OBSERVAÇÃO DA RECUPERAÇÃO

Sim
 Não

Período de observação (em horas): _____

10.8.2. USO DE ANALGESIA

Sim
 Não

Justificar o NÃO-uso de analgesia pós-operatório, quando for o caso:

--

Fármaco	
Dose (UI ou mg/kg)	
Via de administração	

Frequência	
Duração	

Utilize esta tabela para o preenchimento de um fármaco. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os fármacos sejam contemplados.

No campo “fármaco”, deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

10.8.3. OUTROS CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Sim	<input type="checkbox"/>
Não	<input checked="" type="checkbox"/>

Descrição:

--

10.9. EXPOSIÇÃO / INOCULAÇÃO / ADMINISTRAÇÃO

Sim	<input checked="" type="checkbox"/>
Não	<input type="checkbox"/>

Fármaco/Outros	Hemoderivado
Dose	10 mg/mL
Via de administração	Subcutâneo
Frequência	Área plantar das patas posteriores

No campo “fármaco”, deve-se informar o(s) nome(s) do(s) princípio(s) ativo(s) com suas respectivas Denominação Comum Brasileira (DCB) ou Denominação Comum Internacional (DCI).

11. EXTRAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Sim	<input checked="" type="checkbox"/>
Não	<input type="checkbox"/>

Material biológico	Linfonodo Sentinela
Quantidade da amostra	2
Frequência	2
Método de coleta	Incisão na região inguinal

Utilize esta tabela para o preenchimento de um material biológico. Copie, cole e preencha a tabela, quantas vezes forem necessárias, até que todos os materiais sejam contemplados.

12. FINALIZAÇÃO

12.1. MÉTODO DE INDUÇÃO DE MORTE

Descrição	Quando a cirurgia terminar, será realizada a exsanguinação por punção cardíaca, uma vez que se encontram em anestesia geral.
Substância, dose, via	

Caso método restrito, justifique:

--

12.2. DESTINO DOS ANIMAIS APÓS O EXPERIMENTO

Biotério do departamento de Farmacologia.

12.3. FORMA DE DESCARTE DA CARÇAÇA

--

13. RESUMO DO PROCEDIMENTO (relatar todos os procedimentos com os animais)

Sendo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da nossa universidade (UFC), o estudo experimental será cirúrgico prospectivo. Ele terá lugar no laboratório de cirurgia experimental Prof Saul Goldenberg, a fim de avaliar a utilização das substâncias derivadas da hemólise das hemácias. Aproximadamente 30 ratas fêmeas, com 600 mg de peso médio, serão cedidas pelo biotério da Farmacologia-UFC para serem estudadas.

Após coleta de sangue total doado pelo HEMOCE, faremos a lavagem e hemólise apropriada das hemácias. Em seguida, avaliaremos a utilização das substâncias derivadas da hemólise das hemácias isoladas após estudo proteômico, no mapeamento e na identificação do linfonodo sentinela através da aplicação do hemoderivado e das suas frações após purificação, nas patas posteriores de ratos fêmeas e adultas. Os animais deverão ser pesados e após a imobilização apropriada serão anestesiados com uma aplicação por via intraperitoneal de Quetamina (peso/100 em ml) e Xilazina (peso/100 em ml) imediatamente antes da experiência. Posteriormente, serão realizadas incisões em ambas as patas posteriores e região inguinal para observação da coloração do linfonodo sentinela, onde em uma pata será injetada o azul patente para o controle positivo e em outra pata a amostra a ser estudada que é identificada pela sua cor. Quando a cirurgia terminar, a eutanásia do animal será realizada por deslocamento cervical.

Após o procedimento no animal, a drenagem pelos vasos linfáticos e o linfonodo sentinela serão avaliados pela sua cor e os linfonodos corados serão retirados para avaliação pelo método de Pearls . Assim, será possível realizar uma triagem de qual(is) substância(s) é(são) responsável(eis) pela coloração efetiva dos vasos linfáticos e conseqüentemente dos linfonodos.

14. TERMO DE RESPONSABILIDADE

(LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)

Eu, Mayara Maia Alves (nome do responsável), certifico que:

- a) li o disposto na Lei Federal 11.794, de 8 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;

- b) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, tem mérito científico e que a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- c) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa ao projeto.

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

Encaminhar em 2 vias.

A critério da CEUA, poderá ser solicitado o projeto, respeitando confidencialidade e conflito de interesses.

Quando cabível, anexar o termo de consentimento livre e esclarecido do proprietário ou responsável pelo animal.

15. RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

A Comissão de Ética no uso de animais, na sua reunião de ____ / ____ / ____,
APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

A Comissão de Ética No Uso de Animais, na sua reunião de ____ / ____ / ____,
emitiu o parecer em anexo e retorna o Protocolo para sua revisão.

Assinatura: _____

Coordenador da Comissão

* **GRAU DE INVASIVIDADE (GI) - definições segundo o CONCEA**

GI1 = Experimentos que causam pouco ou nenhum desconforto ou estresse (ex.: observação e exame físico; administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou intramuscular de substâncias que não causem reações adversas perceptíveis; eutanásia por métodos aprovados após anestesia ou sedação; privação alimentar ou hídrica por períodos equivalentes à privação na natureza).

GI2 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve intensidade (ex.: procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves).

GI3 = Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de intensidade intermediária (ex.: procedimentos cirúrgicos invasivos conduzidos em animais anestesiados; imobilidade física por várias horas; indução de estresse por separação materna ou exposição a agressor; exposição a estímulos aversivos inescapáveis; exposição a choques localizados de intensidade leve; exposição a níveis de radiação e compostos químicos que provoquem prejuízo duradouro da função sensorial e motora; administração de agentes químicos por vias como a intracardíaca e intracerebral).

GI4 = Experimentos que causam dor de alta intensidade (ex.: Indução de trauma a animais não sedados).