



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

RANIERI DOS SANTOS ROLIM

IDENTIFICAÇÃO DE LINFONODOS SENTINELA DA MAMA
COM AZUL DE METILENO EM MODELO CANINO

FORTALEZA

2010

RANIERI DOS SANTOS ROLIM

**IDENTIFICAÇÃO DE LINFONODOS SENTINELA DA MAMA COM
AZUL DE METILENO EM MODELO CANINO**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da
Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto
Pinheiro

FORTALEZA

2010

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pelo autor

R157i Rolim, Ranieri dos Santos

Identificação de linfonodos sentinela da mama com azul de metileno em modelo canino/ Ranieri dos Santos Rolim. – Fortaleza, 2010.

81 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Cirurgia. Fortaleza, Ceará.

1. Modelos Animais 2. Neoplasias da Mama 3. Biopsia de Linfonodo Sentinela 4. Azul de Metileno I. Pinheiro, Luiz Gonzaga Porto (orient.). II. Título.

CDD: 616.99449

Ranieri dos Santos Rolim

**IDENTIFICAÇÃO DE LINFONODOS SENTINELA DA MAMA COM
AZUL DE METILENO EM MODELO CANINO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. Dr. Francisco Edson de Lucena Feitosa
Universidade Federal do Ceará - UFC

DEDICATÓRIA

A Deus, princípio causal de todas as coisas.

*Aos meus pais, Expedito Nonato dos Santos e Antônia Alves Rolim,
e às minhas irmãs Rejane Rolim dos Santos e Relva Gardene Rolim dos Santos,
pelo apoio incondicional desde o início da carreira.*

*A minha estimada esposa, Márjorie Sabino Façanha Barreto Rolim,
pelo estímulo e dedicação na realização da obra.*

*Aos meus filhos Marina Façanha Rolim e Ranieri dos Santos Rolim Filho,
frutos da minha esperança.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador do Programa de Pós-graduação *stricto sensu* da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, meus sinceros agradecimentos pelo incentivo e dedicação nas suas atividades neste programa.

Ao Prof. Dr. Lusmar Veras Rodrigues, vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em cirurgia, exemplo de dedicação e ensino.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Porto Pinheiro, chefe do Serviço de Mastologia da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand e ao Coordenador do Laboratório de Cirurgia Experimental, Dr. Saul Goldenberg, pelo fundamental incentivo, colaboração e orientação para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Edson de Lucena Feitosa, chefe do Setor de Medicina Materno-Fetal da Maternidade-Escola Assis Chateaubriand e Preceptor da Residência Médica em Tocoginecologia da Universidade Federal do Ceará, modelo e lição de empenho científico na profissão, e pela disponibilidade incondicional na participação na defesa deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima, professor e orientador da Escola Cearense de Oncologia, professor do Departamento de Cirurgia da Universidade Estadual do Ceará, pela disponibilidade em participar da banca de defesa desta dissertação.

À Prof.^a Dr.^a Lucia Libanez Bessa Campelo Braga, coordenadora do Programa de Residência em Gastroenterologia, chefe do Serviço de Gastroenterologia do Hospital Walter Cantidio e professora de Gastroenterologia do Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, por sua imprescindível orientação na qualificação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães, Professor Associado da Universidade Federal do Ceará, Chefe do Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pela disponibilidade de participar na qualificação deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Henrique Diógenes Vasques, mestre em cirurgia pela Universidade Federal do Ceará e coordenador municipal do SISMAMA e SISCOLO, pela amizade, apoio e disponibilidade em participar da qualificação desta tese.

Aos alunos da graduação, Pedro Macedo Esmeraldo Barbosa, Diego Alves Cruz, Géssica Cavalcante Benevides Urbano Maia e João Ivo Xavier Rocha, pela colaboração nos experimentos e coleta de dados.

Ao Prof. Dr. Luciano Lima Correia e ao aluno da graduação Hermano Alexandre Lima Rocha, pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao colega e amigo Paulo Henrique Walter de Aguiar, pelo incentivo e colaboração.

Às secretárias do Curso de Mestrado em Cirurgia, Luciene e Magda, por todo o apoio e atenção dedicados aos alunos da pós-graduação.

Aos que fazem parte da Clínica Omnimagem, que gentilmente forneceram materiais para os experimentos.

Aos diretores e funcionários do Centro de Zoonose de Fortaleza, que prontamente disponibilizaram os animais para a pesquisa.

RESUMO

Objetivos. Desenvolver um modelo experimental para identificação de linfonodo sentinela (LS) da mama da cadela com uso de corante azul de metileno e compará-lo com o azul patente, controlados por tecnécio. **Métodos.** O trabalho foi realizado em 23 cadelas, tendo-se observado a marcação dos LS do primeiro par superior de mamas ao se injetarem 0,2 ml de Tecnécio 99m ligado ao fitato (Tc 99m) e 0,5 ml de azul patente Guerbet V 2,5 % nos espaços subpapilares das mamas direitas e 0,2 ml de Tc-99m e 0,5 ml do azul de metileno 1 % nos mesmos espaços das mamas esquerdas. **Resultados.** Na mama direita, as técnicas de biopsia de LS quando utilizados o Tc-99m e azul patente foram concordantes. Dos 23 LS estudados, somente um não corou nem foi captante. O azul patente foi eficaz em 100 % quando comparado com os dois métodos associados. Na mama esquerda, dos 23 LS estudados, somente dois não coraram e um não foi captante, sendo esta diferença estatisticamente não significativa. A técnica de biopsia do LS utilizando-se o azul de metileno apresentou-se com eficácia de 91,3 % quando utilizado isoladamente e de 100 % quando associado ao Tc-99m. **Conclusão.** O uso do azul de metileno associado ao radiofármaco pode ser considerado como técnica potencial na pesquisa transoperatória do LS das mamas, sendo uma opção menos onerosa e com menores efeitos alérgicos do que o azul patente.

Palavras-chave: Modelos Animais. Neoplasias da Mama. Biopsia de Linfonodo Sentinela. Azul de Metileno.

ABSTRACT

Objectives. To develop an experimental model for identification of sentinel lymph node (SLN) of breast bitch with the use of methylene blue and compares it with the patent blue, both associated with technetium. **Methods.** 23 dogs, there was the marking of the SLN of the first upper pair of breasts to inject 0.2 ml of Tc-99m phytate bound to (99m) and 0.5 ml of patent blue Guerbet V 2,5 % in subpapilar spaces right breast and 0.2 ml of 99mTc and 0.5 ml of 1% methylene blue in the same spaces left breast. **Results.** In the right breast biopsy techniques using 99mTc SLN and blue dye are in agreement. Of the 23 SLN studied, only one was not flushed nor uptake. The patent blue was effective in 100% when compared with the two methods together. The left breast of 23 SLN studied, only two non-stained and one was not uptake, this difference was not statistically significant. The SLN biopsy technique using methylene blue appeared with a 91.3% effectiveness when used alone and 100% when associated with 99mTc. **Conclusion:** The use of methylene blue associated with the radiotracer technique can be considered as potential research intraoperative SLN of breast, suggesting a less costly and less allergenic effects that blue patent.

Keywords: Animal Models. Breast Neoplasms. Sentinel Lymph Node Biopsy. Methylene Blue.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLS	Biopsia de Linfonodo Sentinela
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DNA	Desoxyribonucleic acid ou ácido desoxirribonucléico
GEEON	Grupo de Educação e Estudos Oncológicos
IARC	<i>International Agency Research in Cancer</i>
IM	Intramuscular
IMC	Índice de Massa Corpórea
LS	Linfonodo Sentinela
MEAC	Maternidade-Escola Assis Chateaubriand
NIH consensus	National Institute of Health Consensus
QD	Quantum dots
SC	Subcutâneo
SPSS	Statistical Package for the Social Science
Tc-99m	Isótopo Tecnécio peso atômico 99
T1a	Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm
T1b	Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1,0 cm
T1c	Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2,0 cm
T2	Tumor maior que 2,0 cm e menor ou igual a 5 cm
T3	Tumor maior que 5 cm
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Correlação dos dados obtidos por meio de biopsia do LS da mama cranial direita das cadelas, quando utilizadas as técnicas com tecnécio e azul patente.....	39
Tabela 2	Avaliação da eficácia da biopsia do LS da mama cranial direita das cadelas, utilizando a técnica com azul patente.....	39
Tabela 3	Avaliação da eficácia da biopsia do LS da mama cranial direita das cadelas, utilizando a técnica com Tc-99m.....	40
Tabela 4	Correlação dos dados obtidos mediante biopsia do LS da mama cranial esquerda das cadelas, quando utilizadas as técnicas com tecnécio e azul de metileno.....	40
Tabela 5	Avaliação da eficácia da biopsia do LS da mama cranial esquerda das cadelas, utilizando a técnica com azul de metileno.....	41
Tabela 6	Avaliação da eficácia da biopsia do LS da mama cranial esquerda das cadelas, utilizando a técnica com Tc-99m.....	41
Figura 1	Indução anestésica via intramuscular.....	29
Figura 2	Punção para o acesso venoso periférico.....	30
Figura 3	Injeção de 0,2 ml Tc-99m intradérmica, no sítio subareolar, nos pares das mamas anteriores da cadela. Tempo zero do experimento.....	30
Figura 4	Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama- <i>probe</i> no sítio de injeção à direita, revelando captação máxima. Tempo zero do experimento.....	31

Figura 5	Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho <i>gama-probe</i> no sítio de injeção à esquerda, revelando captação máxima. Tempo zero do experimento.....	31
Figura 6	Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho <i>gama-probe</i> em região axilar direita. Tempo do experimento: 5 minutos.....	32
Figura 7	Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho <i>gama-probe</i> em região axilar esquerda. Tempo do experimento: 5 minutos.....	32
Figura 8	Injeções intradérmicas no sítio subareolar, nos pares das mamas anteriores da cadela de corantes azul patente à direita e azul de metileno à esquerda. Tempo do experimento: 10 minutos.....	33
Figura 9	Localização de ducto linfático aferente do LS de mama esquerda, corado com azul de metileno. Tempo do experimento: 20 minutos.....	34
Figura 10	Localização radioguiada e contagem da captação da radiação com o uso do aparelho <i>gama-probe</i> em LS da mama direita <i>in vivo</i> . Tempo 20 minutos.....	34
Figura 11	Localização radioguiada e contagem da captação da radiação com o uso do aparelho <i>gama-probe</i> em LS da mama esquerda <i>in vivo</i> . Tempo 20 minutos.....	35
Figura 12	Localização do LS de mama direita corado com azul patente. Tempo 20 minutos.....	35
Figura 13	Localização do LS de mama esquerda corado com azul de metileno. Tempo 20 minutos.....	36
Figura 14	Contagem da captação da radiação de LS da mama direita corado com azul patente <i>ex vivo</i> . Tempo 20 minutos.....	36
Figura 15	Contagem da captação da radiação de LS da mama esquerda corado com azul de metileno <i>ex vivo</i> . Tempo 20 minutos.....	37
Figura 16	Linfonodo não corado, LS corado com azul de metileno e LS corado com azul patente, respectivamente, da esquerda para a direita.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Geral.....	25
2.2	Específicos.....	25
3	MÉTODOS.....	26
3.1	Critérios de Inclusão.....	26
3.2	Critérios de Exclusão.....	26
3.3	Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa.....	27
3.4	Cronograma.....	27
3.5	Materiais.....	27
3.6	Desenho do Estudo.....	28
3.7	Análise Estatística.....	38
4	RESULTADOS.....	39
5	DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49
	APÊNDICES.....	56
	ANEXO.....	81

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um enorme desafio para a saúde pública. O aumento crescente do número de pacientes acometidos por esta patologia é constante em todo o mundo, sendo estimado pela IARC (International Agency Research in Cancer), um incremento de 0,5 % de incidência para todas as mulheres. Nos países em desenvolvimento, acrescenta-se um percentual associado ao crescimento da expectativa de vida e à mudança comportamental das mulheres. No Brasil, o câncer de mama é a principal causa de morte por neoplasias entre as mulheres. No mundo, este tipo de patologia corresponde a 22 % de todos os novos casos de câncer, sendo responsável por 14 % de todas as mortes por doenças malignas no globo (ZELENIUCH-JACQUOTTE; SHORE, 2005). O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia maligna mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22 % dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2010 é de 49.000, com risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. Na Região Sudeste, esta patologia é a mais incidente entre as mulheres, com um risco estimado de 65 casos novos por 100 mil. Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (17/100.000). Para o Estado do Ceará, é esperado que haja 1660 novos casos de câncer de mama no ano de 2010, com risco estimado de 37,2/100.000. Em Fortaleza, o número de casos novos esperados para este ano é de 660 (INCA, 2010).

Em relação ao estadiamento por ocasião do diagnóstico, observa-se que, nas sociedades mais evoluídas, este se faz mais precocemente. Holland, na sexta edição do *Principles of Oncology* (HOLLAND *et al.*, 2001), acentua que nos Estados Unidos, em 95 % dos casos, o diagnóstico é realizado nos estágios I e II. No ano de 2009, no Serviço de Mastologia da Maternidade-Escola Assis Chateaubrinad - Universidade Federal do Ceará (MEAC-UFC), em 40 % dos casos o diagnóstico foi feito nos estágios III e IV, pois no Brasil os programas de rastreamento de câncer de mama ainda estão em desenvolvimento, há carência de especialistas em mastologia e os programas educacionais ainda são escassos.

A drenagem para os linfonodos axilares é, sem dúvida, a maior via de disseminação da neoplasia mamária. Halsted foi o primeiro a descrever a importância do

esvaziamento axilar em pacientes com câncer de mama, com metástase linfática ou não (WEISS; GILBERT; BALLON, 1980). Seus trabalhos culminaram no desenvolvimento da mastectomia radical que leva seu nome e que, por quase um século, foi tratamento-padrão do câncer de mama. Outra via de drenagem linfática, que é responsável por 25% da drenagem da mama, faz-se por linfonodos da cadeia mamária interna (TURNER; WARWICK, 1959).

O tratamento do câncer mamário sempre respeitou os paradigmas oncológicos, principalmente quando, em 1894, William Halsted reportou o trabalho original “resultados de cura de câncer de mama” (BLAND; COPELAND III, 2004).

A mastectomia radical de Halsted, introduzida em 1882, foi difundida mundialmente e cientificamente adotada pelo Hospital Johns Hopkins, em Baltimore (Maryland – EUA). A conduta halstediana baseava-se no conceito de que a ressecção em bloco da mama, músculos peitorais maior e menor e linfonodos regionais, prevenia a recidiva local e regional (BLAND; COPELAND III, 2004).

A era da cirurgia radical da mama continuou e ressecções mais alargadas foram incorporadas ao arsenal cirúrgico, como a mastectomia suprarradical de Urban, na qual a dissecação abrangia, além do conteúdo axilar, linfonodos da cadeia mamária interna.

A contribuição de Haagensen foi a sua dedicação à cirurgia da mama e ao estudo das afecções mamárias. Classificou cânceres de mama de acordo com o tamanho, achados clínicos e estado linfonodal (BLAND; COPELAND III, 2004).

Cirurgias menos radicais foram incorporadas na propedêutica mamária com resultados semelhantes aos procedimentos radicais. Introduziu-se o primeiro conceito de cirurgia radical modificada, por Patey e Dyson, com preservação do músculo peitoral maior e ressecção do músculo peitoral menor, em 1940 e, posteriormente, aprimorada por Madden, com preservação dos dois músculos peitorais (BLAND; COPELAND III, 2004).

O linfonodo da axila detém o mais importante fator prognóstico para as pacientes com câncer de mama potencialmente curáveis. O prognóstico é correlacionado à extensão do comprometimento dos linfonodos e mais diretamente com o número de linfonodos comprometidos (CARTER *et al.*, 1989).

A dissecação axilar faz parte do tratamento do câncer de mama. A cirurgia da doença maligna respeita os conhecimentos anatômicos do órgão, principalmente no que se refere a sua drenagem linfática. O exame clínico da axila em pacientes com câncer de mama apresenta baixa acurácia na identificação de metástase linfonodal, com taxa de erro de 40%. A utilização da ultrassonografia em mulheres com câncer de mama inicial incrementa a acurácia, podendo chegar a 67 % (CHUNG; CADY, 2004).

A incidência de metástases linfonodais aumenta com o tamanho do tumor. A incidência de comprometimento linfonodal em cânceres invasivos menores do que 5 mm foi de menos de 10 % (CHUNG; CADY, 2004).

Estudo realizado em 24.740 casos de câncer de mama, quando foi observada a relação tamanho do tumor e envolvimento linfonodal, mostrou que, mesmo em tumores acima de 4 cm, de 29 a 47,9 % tiveram estado linfonodal negativo. Na proporção que o tumor aumenta de tamanho, ocorre um incremento do estágio metastático da axila (CARTER *et al.*, 1989).

A axila foi dividida em três níveis funcionais, conforme a relação com o músculo peitoral menor (KINNE, 1993). A remoção dos níveis I e II é prática da maioria dos cirurgiões, conforme consenso do National Institute of Health Consensus (NIH Consensus, 1991).

O processo cirúrgico de linfadenectomia axilar radical pode proporcionar morbidade importante e irreversível. As principais complicações podem ser de caráter permanente ou transitório: linfedema, seroma, infecções da ferida, disfunção motora e sensitiva do ombro ipsilateral, dor crônica neuropática, obstrução linfática dolorosa, celulites e tromboflebites. Dentre essas complicações, o linfedema acomete cerca de 15 a 20% das pacientes tratadas para câncer de mama com esvaziamento axilar. Além do exposto, acrescenta-se o custo elevado do procedimento (LIN *et al.*, 1993).

A avaliação dos linfonodos da cadeia axilar em pacientes acometidas por câncer de mama é impositiva, uma vez que a presença ou ausência de comprometimento metastático dos mesmos constitui fator prognóstico isolado mais importante da neoplasia. Por tal motivo,

a dissecação completa da axila tradicionalmente vinha sendo realizada de maneira sistemática, em todos os cânceres operáveis de mama.

É importante ressaltar, contudo, que o exame histopatológico dos linfonodos axilares removidos mostra a ausência de metástases em parte considerável dos casos de câncer de mama, especialmente naqueles em que a neoplasia se encontra em estágio inicial de desenvolvimento. Em estudo que envolveu 1128 mulheres acometidas por câncer de mama, Silverstein *et al.* verificaram que em apenas 3 % das pacientes com tumor primário estágio T1a existiam metástases em linfonodos da cadeia axilar; naquelas com tumores em estágio T1b, T1c, T2 e T3, as taxas de comprometimento axilar observadas foram de 17 %, 32 %, 44 % e 69 %, respectivamente (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

Assim, em um número elevado, pacientes vem sendo submetidas a desnecessária dissecação axilar nos serviços que não dispõem de metodologia para fazer a predição do estado linfonodal axilar.

No sentido de se evitar a prática da dissecação axilar completa em mulheres com câncer inicial de mama, foram feitos estudos para avaliar a praticabilidade da realização da cirurgia axilar menos agressiva, isto é, remoção apenas da base axilar onde estão contidos os linfonodos do nível I. Dentre esses estudos, destaca-se aquele realizado por Veronesi *et al.* (1990) avaliando os linfonodos dos níveis II e III. Esses pesquisadores verificaram que a taxa de metástases foi de 12,1 %, quando apenas um linfonodo da porção removida se apresentava comprometido e de até 83,9 % quando o comprometimento era de quatro ou mais linfonodos. Concluíram que a dissecação exclusiva da base da axila é uma estratégia inadequada, uma vez que o achado de comprometimento linfonodal no material extirpado exige o retorno da paciente à sala de cirurgia para a prática do esvaziamento axilar completo (VERONESI *et al.*, 1990).

A predição do estado linfonodal axilar em mulheres acometidas por câncer de mama teve notável impulso com o advento do estudo do linfonodo sentinela, primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática da área que contém o tumor primário.

Esse conceito de linfonodo sentinela (LS) é orientado em dois princípios básicos: a existência de um padrão previsível de drenagem linfática para linfonodo regional e o funcionamento do primeiro linfonodo como filtro eficaz para as células tumorais.

Historicamente, um dos primeiros relatos na identificação de LS foi feito pós parotidectomia com biópsia deste na junção da porção anterior e posterior da veia facial com exame de congelação, em 1951 (TANIS *et al.*, 2001). A expressão “linfonodo sentinela” foi utilizada pela primeira vez por Gould *et al.* (1960), ao estudarem o câncer de parótida (GOULD; WINSHIPT BHILBIN, 1960).

A administração de contraste nos linfáticos da mama fora realizada e estes visualizados com a adição de azul patente, por Kett *et al.* (1970) *apud* Tannis *et al.* (2001), com o objetivo de facilitar a identificação e esvaziamento dos linfonodos.

Observou-se fluxo para um linfonodo isolado, chamado de “Linfonodo de Sorgius”. Posteriormente, a drenagem seguia através dos vasos linfáticos e linfonodos para o sistema coletor em volta da veia axilar. Haagensen estudou a rota de metástases através do filtro linfonodal axilar e concluiu que os linfonodos do grupo central não são apenas os mais frequentes, mas também, quase exclusivamente, envolvidos. Utilizou-se a expressão “Linfonodo sentinela” para linfonodos específicos, que ocupavam o grupo cervical inferior profundo, por causa da sua relação com a confluência venosa jugulosubclávia (HAAGENSEN, 1972).

Romon Cabanãs descreveu o conceito fisiológico do LS após estudar 80 casos de câncer de pênis, concluindo que, quando a biópsia do LS fosse negativa para metástase, nenhuma complementação cirúrgica com o intuito de retirar os outros linfonodos seria necessária (CABANÃS, 1977).

Em 1977, identificou-se o padrão de drenagem linfática dos melanomas, localizados em áreas ambíguas, utilizando linfocintilografia com ouro coloidal. Associada ao procedimento pré-operatório, foi desenvolvida a técnica de mapeamento intraoperatória para selecionar o linfonodo a ser removido, de acordo com o padrão de drenagem do melanoma primário. O LS foi considerado o primeiro local de metástase da doença (MORTON; WEN; COCHRAN, 1989).

Alex e Krag (1993) idealizaram uma nova tecnologia nãoinvasiva, testando um aparelho manual do tipo sonda de captação de raios gama *probe* em animais (ALEX; KRAG, 1993). Nesse mesmo ano, Krag *et al.* (1993) publicaram projeto-piloto estudando 22 mulheres com cânceres de mama, utilizando o colóide sulfurado ligado com Tc-99m. Encontraram taxa de identificação do LS de 81 % e capacidade preditiva de 100 % para predizer o estado dos linfonodos axilares, justificando a realização de um grande ensaio clínico para confirmar o valor dessa nova técnica (KRAG *et al.*, 1993).

A biopsia do LS é utilizada para estadiar a axila em pacientes de qualquer idade entre 21 e 90 anos (GIULIANO; KIRGAN; GUENTHER, 1994). Giuliano, Kirgan e Guenther (1994) descreveram a técnica com azul patente em 174 mulheres com câncer de mama, demonstrando acurácia preditiva de 100 % do LS em relação ao estado linfonodal axilar.

A proposta do uso da linfocintilografia pré-operatória em conjunto com a radiolocalização intraoperatória para aumentar a acurácia e identificação do linfonodo sentinela foi feito por Veronesi *et al.* (1997). A utilização da injeção subdérmica de albumina coloidal marcada com TC-99m proporcionou taxa de identificação do LS de 98 %, com acurácia de 97,5 % (VERONESI *et al.*, 1997).

As características da drenagem linfática locorregional da mama permitem que os materiais injetados (radiofármacos ou corantes) em diferentes sítios mamários se dirijam ao mesmo LS. Em estudo de 55 pacientes submetidas à injeção de material radioativo, Roumen *et al.* (1999) verificaram que, independentemente do local de injeção, (proximidade do tumor, pele que recobria o tumor ou região para-areolar do quadrante de localização do tumor), ocorreu a marcação concordante do LS em 52 pacientes.

Em pacientes mais idosos, ocorre uma diminuição da taxa de identificação, e a combinação dos métodos (radiocolóide e azul patente) pode incrementar este teor identificatório. Estes achados da redução da taxa de identificação foram vistos em estudos multicêntricos (McMASTERS *et al.*, 2000).

O azul patente é usado com grande frequência na localização de LS em pacientes com câncer de mama. Outros tipos de corante são investigados. Em 2001, foi realizado estudo

com 30 pacientes com o uso de azul de metileno em substituição ao azul patente. Nesse trabalho, a localização do LS foi bem-sucedida em 90% das pacientes, resultado semelhante ao azul patente, demonstrando que o azul de metileno é uma boa alternativa em razão do seu baixo custo (SIMMONS; SMITH; OSBORNE, 2001).

Inúmeros trabalhos têm validam a pesquisa do LS na mama, utilizando técnicas com corante azul patente e/ou substância radioativa guiado por gama-*probe*, injetados no espaço subpapilar. Estes métodos têm sensibilidade e especificidade semelhantes na pesquisa do LS da mama. As técnicas mostram-se complementares, de alta acurácia e aumentam a eficácia quando os métodos são associados (D'EREDITA *et al.*, 2002; XAVIER *et al.*, 2002; CSERNI *et al.*, 2002; REITSAMER *et al.*, 2003).

Modelos experimentais para a detecção de LS de mama de cadelas já são adotados, como é o caso do estudo de detecção mediante o uso de tecnécio e azul patente, que demonstrou que o uso isolado ou associado destes métodos é de grande valor para a identificação do LS da mama destes animais. Sabe-se que a drenagem linfática das mamas desses animais, sobretudo dos três primeiros pares, drenam para os linfonodos axilares propriamente ditos. Eles estão situados ventralmente à artéria e veia toracodorsal. Os vasos linfáticos provenientes das mamas posteriores da cadela, sobretudo dos últimos três pares, drenam para os linfonodos inguinais superficiais (linfonodos mamários). Estes estão localizados aproximadamente 3 a 4 cm cranialmente ao osso púbico na face dorsolateral das glândulas mamárias. O tamanho dos linfonodos varia de 0,5 a 5,0 cm. Geralmente, há dois linfonodos presentes, embora algumas vezes três ou quatro possam ser localizados, variando de 0,5 a 2,0 cm de comprimento (PINHEIRO *et al.*, 2003)

O azul patente é tradicionalmente usado como um marcador para mapear o sistema linfático durante a identificação do LS. As reações alérgicas, no entanto, podem ser fatais. Eldrageely *et al.* (2004) estudaram corante azul de metileno como traçador para a biopsia do LS, comparando-o com o azul patente. Em uma análise de 164 casos, não houve diferença clínica e estatisticamente significativa na taxa de sucesso da biopsia do LS ($P = 0,22$), no número de LS detectados ($P = 0,46$), na concordância com o isótopo radioativo ($P = 0,92$), ou na incidência de metástase ($P = 0,87$), quando o marcador azul de metileno foi comparado ao azul patente. Nenhuma reação adversa a qualquer corante azul foi observada. A injeção intraparenquimatosa do corante azul de metileno foi considerado um marcador confiável para

o sistema linfático e identificação LS no câncer de mama, sendo um corante seguro, barato e facilmente disponível.

Mamounas *et al.* (2005), estudando pacientes com câncer de mama, concluíram não haver diferença estatisticamente significativa nas taxas de identificação ao utilizar as técnicas de BLS, utilizando radiocolóide, azul patente e a associação das técnicas.

Com a crescente popularidade da BLS, as complicações potenciais do uso do azul patente devem ser apreciadas. Trabalho realizado por Thevarajah *et al.* (2005) concluiu que o uso do corante azul patente para BLS está associado com um número significativo de reações alérgicas, algumas das quais fatais. Como corante azul de metileno se mostra igualmente eficaz e não representa um sério risco de reações alérgicas de natureza grave, este se constitui como um método seguro para BLS.

Estudo realizado de 2003 a 2005 com o mapeamento de LS por intermédio de injeção de azul de metileno foi encorajador. Todos os pacientes com LS positivos submeteram-se a dissecação completa dos linfonodos axilares. Durante o estudo, 141 pacientes consecutivas com axila negativa e sem evidência de câncer de mama inflamatório submeteram-se somente a injeção de azul de metileno, sendo o LS identificado em 96,5% das pacientes. Não houve casos de anafilaxia (GOLSHAN; NAKHLIS, 2006).

Há relatos de reações alérgicas ao corante com diferentes graus de severidade. Relata-se um caso de reação anafilática severa, após injeção intradérmica do corante azul patente, em paciente com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ*. O corante azul patente, apesar de facilitar a detecção do linfonodo, apresenta risco de desencadear reações anafilactóides. É necessário que a equipe envolvida tenha preparo para diagnosticar e tratar esta complicação (SHINZATO *et al.*, 2006).

Huang *et al.* (2007) avaliaram a eficácia do corante azul de metileno como marcador na BLS para câncer de mama e analisaram seus fatores de influência para a detecção. De março de 2005 a fevereiro de 2006, 101 pacientes com câncer de mama operável com axila negativa foram incluídas neste estudo. O azul de metileno foi utilizado isoladamente como agente marcador para BLS. O esvaziamento axilar foi realizado após BLS. A taxa de identificação do LS foi de 96,04% (97/101). O índice de massa corporal

(IMC) foi relacionado com a taxa de identificação do LS e com a taxa de falso-negativos da BLS. Nenhuma reação alérgica e necrose da pele foram observadas. O azul de metileno demonstrou ser um agente seguro e confiável para BLS em pacientes com câncer de mama, sendo necessária uma tecnologia mais avançada para pacientes com maior IMC.

Estudo retrospectivo com 329 pacientes com câncer de mama em estágio inicial foi realizado em 2008. Pacientes com axila positiva, tumores maiores do que 2 cm na avaliação clínica e radiológica, câncer de mama prévio, cirurgia axilar anterior e quimioterapia neoadjuvante foram excluídos do estudo. Cento e setenta e três pacientes foram submetidas à BLS com 1 mL de azul de metileno a 1 %, outras 156 pacientes foram submetidas a técnica combinada com azul de metileno e radiofármaco. A divisão dos grupos ocorreu de forma randomizada. As injeções do corante e radioisótopo foram no plano subcutâneo e na região subareolar. O linfonodo foi examinado por microscopia-padrão. Não houve relato de complicações com o uso do azul de metileno, exceto por tatuagens temporárias. A taxa de identificação do LS com o uso de azul de metileno foi de 97,6 %. As reações adversas relatadas para o uso do corante azul patente variaram de leves a graves reações anafiláticas (1-3 %), tendo sido necessária a reanimação vigorosa do paciente. Portanto, a técnica com o azul de metileno para localização do LS é segura e eficaz (VARGHESE *et al.*, 2008).

Entre janeiro de 2005 e junho de 2007, foi realizado estudo randomizado com 159 pacientes acometidos com melanoma cutâneo de intermediário e alto risco, tratados no Yale Melanoma Unit. O objetivo desse estudo foi comparar a eficácia do azul de metileno com a do azul patente para identificação do LS em melanoma cutâneo, em razão da maior disponibilidade e segurança daquele corante. Um total de 443 LS foi identificado. O azul de metileno demonstrou ser tão eficaz quanto o azul patente na identificação do LS. O azul de metileno foi visualizado em 62% dos casos, enquanto o azul patente foi 58 % (LIU *et al.*, 2008).

As reações de hipersensibilidade imediata ao azul patente, como urticária, broncoespasmo ou choque anafilático não são raras, sendo observada em 0,8 a 2,8% dos pacientes submetidos à injeção deste corante. Em 2008, foram relatados três casos de choque anafilático e dois casos de urticária após a injeção de azul patente no contexto da detecção do LS em pacientes com câncer de mama. Imediatamente após a cirurgia, dois pacientes

desenvolveram urticária generalizada, seguida de colapso circulatório, necessitando de reanimação. O terceiro paciente apresentou choque anafilático maciço sem sinais cutâneos ou respiratórios. A urticária sem perturbação hemodinâmica foi observada nos dois últimos pacientes. Testes cutâneos utilizando o azul patente foram positivos para os três pacientes com reações intradérmicas positivas (1 / 10.000 diluição). As reações ao uso do azul patente são geralmente observadas ao final da cirurgia. Embora o modo de sensibilização seja mal compreendido, corantes alimentares e têxteis podem estar relacionados a esta complicação. Testes cutâneos podem fornecer um método simples e confiável para diagnosticar esses eventos. Há um risco real de choque anafilático tardio em razão do uso do corante azul patente, sendo necessário o estudo de métodos alternativos de detecção do LS (JEUDY *et al.*, 2008).

Há relatos de casos isolados de efeitos adversos graves em virtude da injeção de azul de metileno na BLS. Em 2008 foi relatado um caso edema pulmonar associado ao uso deste corante e, em 2010, um caso de reação anafilática (TEKNOS *et al.*, 2008; JANGJOO *et al.*, 2010).

O azul de metileno também pode ocasionar necrose cutânea após injeção intraparenquimatosa, porém este efeito adverso ainda não é bem caracterizado. Pacientes submetidos a BLS para o câncer de mama e melanoma foram revistos, com a atenção dedicada às manifestações cutâneas. Os pacientes submetidos à mastectomia foram excluídos para descartar as alterações de desvascularização do retalho. Noventa e cinco pacientes (78 com câncer de mama e 17 com melanoma) foram submetidos a injeção intraparenquimatosa de azul de metileno durante uma escassez de azul patente nos Estados Unidos, 51 pacientes foram submetidos a cirurgia conservadora da mama. Não houve casos de necrose cutânea franca. Seis (11,8 %) pacientes submetidas a cirurgia conservadora de mama tiveram alterações inflamatórias. Quatro deles desenvolveram achados indistinguíveis de celulite infecciosa. Dois pacientes desenvolveram telangiectasias da pele antes da radioterapia. Dois pacientes tiveram esteatonecrose local em sítio distante da injeção do azul de metileno, um confirmado por imagem e outra por biópsia. Em sua maioria, os sintomas foram resolvidos após o tratamento conservador. Portanto, o azul de metileno pode causar alterações cutâneas leves (BLEICHER *et al.*, 2009).

A escassez de azul patente nos Estados Unidos também incentivou o estudo do uso de azul de metileno para avaliação do LS em tumores gastrointestinais. Entre janeiro 2005 e agosto de 2008, 122 pacientes com tumores gastrointestinais foram registrados. Todos foram submetidos a BLS com injeção subserosa de azul de metileno e azul patente. A eficácia e as taxas de reações adversas foram comparadas entre os dois corantes. Os pacientes foram acompanhados prospectivamente quanto a presença de reações adversas, incluindo anafilaxia e necrose do tecido. A taxa identificação do LS com o uso de azul patente e azul de metileno foi de 96,6 % e 96,7 %, respectivamente. A única reação adversa que ocorreu foi a redução da saturação de oxigênio em mais de 5 %, fato ocorrido em 5 % dos pacientes que se submeteram a injeção de azul patente. O custo por frasco de azul patente foi de \$ 210 e \$ 7 para o azul de metileno (SONI *et al.*, 2009).

East *et al.* (2009), relatam que o azul de metileno é um bom agente na detecção do LS, assim como o azul patente, sendo este de bem maior custo. Em associação com o uso de radiofármaco, a taxa de detecção do LS com o azul patente não se justifica em razão do seu alto custo, quando comparado ao azul de metileno, sendo este o agente de escolha em países em desenvolvimento.

Massanat *et al.* (2009) demonstraram que o azul de metileno e azul patente podem ter efeitos genotóxicos *in vitro* nas células mamárias quando em concentrações comumente utilizadas na prática clínica para a BLS. Estudos *in vivo* são necessários para avaliar e minimizar os danos ao DNA causados por esses corantes.

Pinheiro *et al.* (2009) apresentaram resultados preliminares da hemossiderina como um novo marcador para a identificação de LS mamários em um modelo experimental. Seis cadelas sem raça definida foram estudadas. Injeção de 0,2 ml de tecnécio foi realizada em ambas as mamas superiores. Após 10 minutos, uma solução de 2,5 ml de sangue hemolisado (hemossiderina) do próprio animal foi injetado no plexo linfático subpapilar da mama esquerda e 2,5 ml de azul patente na mama contralateral concomitante e igualmente. Após mais 10 minutos, incisões axilares foram realizadas para a procura, pela coloração e com um *gama-probe*, dos linfonodos sentinela. Sete LS castanhos e radiomarcados foram identificados na axila esquerda. Seis LS azuis e radiomarcados foram identificados na axila direita. Portanto, este marcador pode ser alternativa ao uso dos corantes vitais e de seus efeitos adversos em pacientes submetidos a BLS.

Outros modelos experimentais utilizando a pesquisa do LS vêm sendo estudados. O câncer gástrico ainda possui como perspectiva de cura o tratamento cirúrgico (gastrectomia associada com linfadenectomia ampliada). A pesquisa de LS para este tipo de neoplasia, quando inicial, apresenta argumentos que podem estar modificando esta conduta. Pinheiro *et al.* (2010) desenvolveram modelo experimental também nesta área que se servem de extrema importância para treinamento para cirurgias na aplicação do método.

Outro método de estudo para identificação de metástases em LS é a nanotecnologia com o uso de quantum dots (QD). Para realizar a biopsia do LS de forma eficaz, é importante que as células cancerosas sejam detectadas com alta sensibilidade no LS. A técnica que utiliza os QD é capaz de visualizar uma área de alto risco de metástases com um alto grau de precisão. Os pontos quânticos existentes nessas áreas são brilhantes e correspondem a nanopartículas fluorescentes. Os QD foram endoscopicamente injetados na parede gastrintestinal de suínos, e seu sinal foi detectado especificamente no LS com um dispositivo laparoscópico. Os QDs foram distribuídos de forma heterogênea no LS e sua distribuição marcou o *locus* de influxo de vasos linfáticos aferentes, onde a metástase ganglionar se inicia. Além disso, foi desenvolvido um método utilizando marcador celular QDs conjugados, que visualiza células específicas em LS, sugerindo que este método pode ser aplicado para a detecção de células cancerígenas em LS. Portanto, este método pode aumentar significativamente a taxa de detecção de metástase de câncer no LS (HIKAGE *et al.*, 2010).

Neste trabalho, demonstrar-se-á a eficácia na detecção do LS das mamas de cadelas com a utilização do azul de metileno quando comparado com a técnica já utilizada com o corante azul patente. O incremento desse tipo de pesquisa promove uma opção a modelos já desenvolvidos que apresentam alto custo, difícil disponibilidade e possibilidade de desencadear efeitos adversos e graves.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver um modelo experimental em cadelas para identificação de linfonodo sentinela (LS) da mama com uso de corante azul de metileno e compará-lo com as técnicas que utilizam o azul patente e radiofármaco.

2.2 Específicos

- 1 Localizar o LS da cadeia axilar de cadelas com o uso do azul de metileno injetado no espaço subpapilar da mama, associado ao Tc-99m.
- 2 Demonstrar a eficácia do azul de metileno na detecção do LS da cadeia axilar de cadelas, quando comparado com o azul patente, ambos associados ao uso do Tc-99m.

3 MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental descritivo. Foram utilizadas 56 mamas anteriores oriundas de 28 cadelas adultas sem raça definida da espécie *Canis familiaris*. No projeto-piloto, foi elaborado um protocolo provisório após a realização de cinco experimentos para treinamento da equipe e padronização das etapas.

3.1 Critérios de Inclusão

Para realização do trabalho proposto, foram elegíveis as cadelas conforme os critérios de inclusão adiante delineados:

- clinicamente saudáveis;
- cedidas pelo Centro de Controle de Zoonose da Prefeitura Municipal de Fortaleza; e
- anatomicamente com mamas e mamilos anteriores e bem definidos.

3.2 Critérios de Exclusão

- cadelas de menos de seis meses de idade;
- cadelas de menos de 5 kg;
- cadelas de mais de 15 kg; e
- cadelas anatomicamente com mamas atroficas ou com cicatrizes, cirúrgicas ou não.

3.3 Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa

Foi apresentado requerimento para aprovação desta pesquisa junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), protocolizado sob o número 03/08 e aprovado em reunião no dia 09 de setembro de 2010, dentro das normas legais que regulamentam a pesquisa *in anima vili* do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANEXO A).

3.4 Cronograma

Os experimentos da pesquisa foram iniciados em maio de 2010 e concluídos em julho de 2010, perfazendo um total de 28 cadelas, um animal por experimento, sendo cinco destas utilizadas para projeto-piloto. O número da amostra foi subordinado ao período disponível para a realização dos experimentos.

3.5 Materiais

Os equipamentos utilizados foram duas unidades de gama-*probe* cujos modelos foram NuclearLab-DGC-8 e Navigator-GPS.

O radiofármaco utilizado foi o colóide fitato, marcado com Tecnécio 99 (Tc-99m), fornecido pela Clínica de Radiologia Omnimagem. O material foi preparado no dia do procedimento, utilizando doses inferiores a 0,5 mCi.

Os corantes utilizados foram azul patente Guerbet V 2,5 % e azul de metileno 1%.

Outras substâncias: atropina 0,25 mg/ml na dosagem de 0,05mg/Kg SC; cloridrato de cetamina 50 mg/ml, cloridrato de xilaziana 2% - 20 mg/ml, cloreto de potássio 10 %.

3.6 Desenho do Estudo

Inicialmente foi realizada revisão bibliográfica, enfatizando aspectos relacionados ao tema. Foi elaborado um protocolo para registrar os resultados obtidos em cada procedimento (APÊNDICE A). Efetivou-se a fase preliminar de procedimentos (projeto-piloto), a fim de se padronizar técnicas e materiais, aprimorar-se o protocolo e familiarizar-se com a anatomia da cadela e com os equipamentos utilizados.

Com até três dias de antecedência, o Centro de Zoonose da Prefeitura Municipal de Fortaleza era contatado para o preparo, seleção e fornecimento do animal, que era higienizado e avaliado quanto ao aspecto sanitário. No mesmo intervalo de tempo, a Clínica de Radiologia Omnimagem foi contatada para fornecimento do material radioativo para o experimento. Os materiais cirúrgicos e anestésicos foram checados antes da execução do experimento.

Os experimentos foram realizados utilizando um animal por vez. Foram abordados os pares anteriores das mamas das cadelas.

Foram utilizadas 23 cadelas, pesando aproximadamente quinze quilos, sem raça definida, cedidas pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Fortaleza (Fortaleza – Ceará – Brasil). O critério de inclusão das cadelas foi o sacrifício programado destas por esta entidade. Na manhã do experimento, o animal foi recolhido e encaminhado em transporte adequado disponível no laboratório de cirurgia experimental e acomodado no canil do laboratório de cirurgia experimental Prof. Dr. Saul Goldenberg, situado no Grupo de Educação e Estudos Oncológicos (GEEON).

Na manhã do experimento e ainda no biotério, o animal foi criteriosamente avaliado quanto às condições sanitárias e ao preenchimento dos critérios de inclusão da pesquisa. Aqueles que não perfaziam todos os critérios foram devolvidos ao Centro de Zoonose da Prefeitura Municipal de Fortaleza no mesmo dia.

Após imobilização com técnica apropriada, o animal foi anestesiado via intramuscular (FIGURA 1). Após anestesia, foi injetada atropina 0,25 mg/ml na dosagem de 0,05 mg/kg SC e, após 15 minutos, aplicou-se IM cloridrato de cetamina 50 mg/ml em

solução injetável de 10 ml, sendo administrado na dose de 15 mg/kg de peso, associado a cloridrato de xilaziana 2 % - 20 mg/ml na dosagem de 1,5 mg/kg IM antes do experimento.



Figura 1- Indução anestésica via intramuscular

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

Levada para a sala de procedimento, a cadela foi imobilizada na mesa cirúrgica com ataduras em decúbito dorsal com as patas abduzidas em extensão. O nível de anestesia geral foi monitorado continuamente por meio de parâmetros clínicos que podem indicar a superficialização anestésica, tais como: movimentação das narinas e outros grupos musculares, frequências respiratória e cardíaca. Medicação adicional foi ofertada para complementação de plano anestésico ideal, bem como foi realizada administração de solução fisiológica por punção venosa em uma das patas superiores com scalp 19 ou 21 para manutenção do acesso venoso (FIGURA 2). A tricotomia cuidadosa era realizada nas áreas cirúrgicas da axila caso houvesse necessidade em razão do excesso de pelos.

Inicialmente, um membro da equipe foi destacado para registrar todos os dados, horários e estágios, bem como observações inerentes ao procedimento. A partir daí, o cirurgião injetava 0,2 ml de fitato de Tecnécio-99-mCi, com injeção intradérmica, com agulha de insulina, no sítio subareolar, nos pares das mamas anteriores da cadela (FIGURA 3). Após a injeção, foi realizada contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-*probe* nos sítios de injeção, bilateralmente (FIGURAS 4 e 5). A sonda do aparelho era previamente envolvida com uma luva cirúrgica.

Cinco minutos após a injeção subareolar, foi realizado mapeamento axilar bilateral com a sonda do grama-probe, sendo registrada a captação inerente a cada lado neste intervalo de tempo (FIGURAS 6 e 7).



Figura 2- Punção para o acesso venoso periférico

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

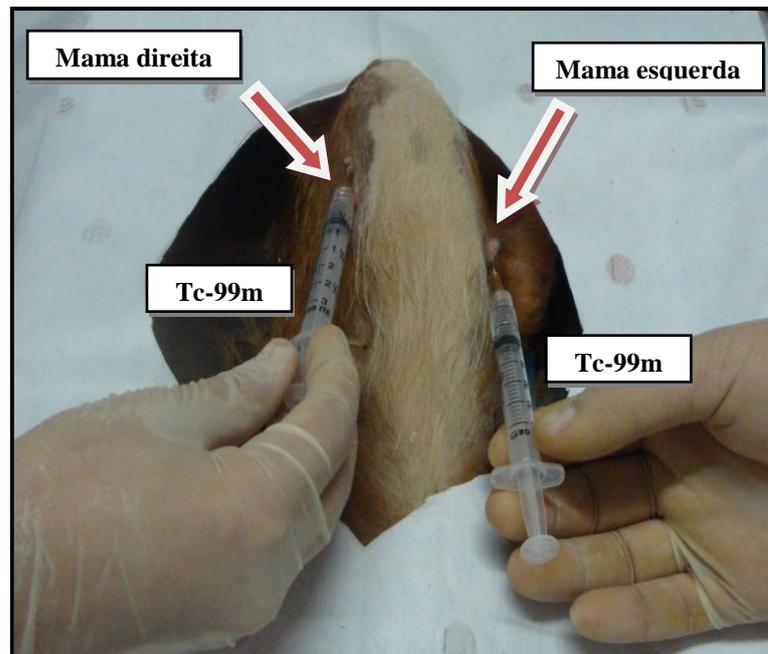


Figura 3- Injeção de 0,2 ml Tc-99m intradérmica, no sítio subareolar, nos pares das mamas anteriores da cadela. Tempo zero do experimento

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figura 4- Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-probe no sítio de injeção à direita, revelando captação máxima. Tempo zero do experimento

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figuras 5- Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-probe nos sítios de injeção à esquerda, revelando captação máxima. Tempo zero do experimento

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figura 6- Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-probe em região axilar direita. Tempo do experimento: 5 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

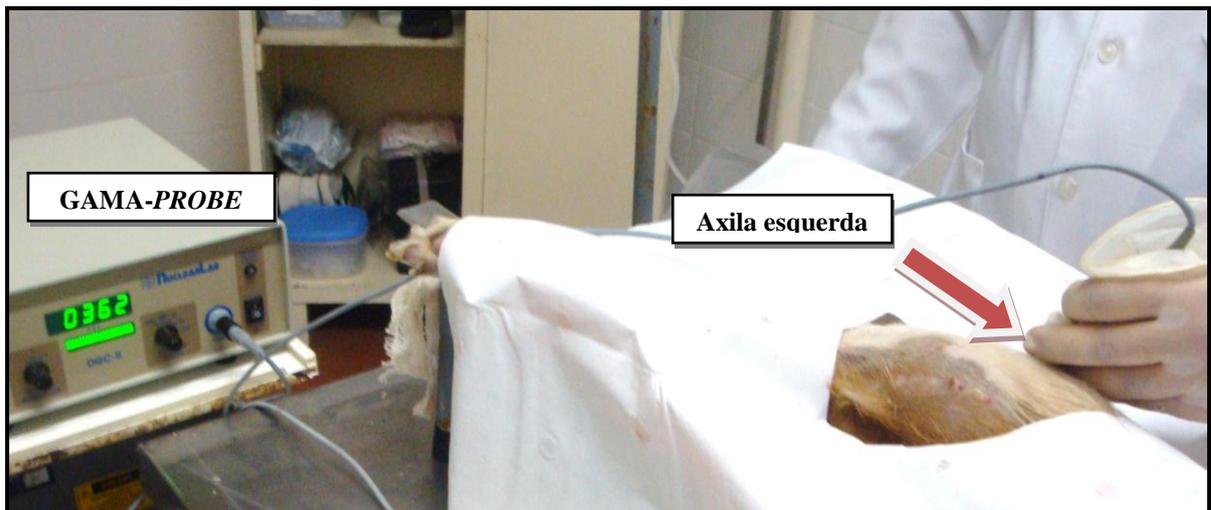


Figura 7- Contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-probe em região axilar esquerda. Tempo do experimento: 5 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

Após mais cinco minutos, uma nova contagem foi realizada. Nesta mesma ocasião, foram injetados na região subareolar da mama direita 0,5 mL azul patente a 2,5 % e, da mama esquerda, 0,5 mL de azul de metileno a 1 % (FIGURA 8). Após cinco minutos da injeção dos corantes, realizou-se nova contagem de captação da radiação na região axilar bilateral, fato repetido após mais cinco minutos. Imediatamente após esta última contagem, incisões de aproximadamente 3 cm foram realizadas nos sítios de maior captação axilar,

seguida de dissecção cuidadosa dos planos, sendo guiada pela visualização da coloração azulada da rede linfática aferente que direciona para a identificação do(s) linfonodo(s) sentinela(s) (FIGURA 9), o que foi confirmado com auxílio da sonda do aparelho gama-*probe*. Identificado o LS, nova contagem da captação do LS foi realizada *in vivo* (FIGURAS 10 e 11) e este observado se estava corado ou não (FIGURAS 12 e 13). Identificado o linfonodo, seja pelo corante ou pelo gama-*probe*, este foi ressecado e submetido a uma nova contagem da captação *ex vivo* (FIGURAS 14 e 15). Considerou-se significativa uma captação que representava no mínimo cinco vezes o superior à radioatividade residual de fundo da axila ou “The background radioactivity”.

A figura 16 mostra a distinção de coloração entre os linfonodos não corados, corados com azul de metileno e com azul patente, respectivamente.

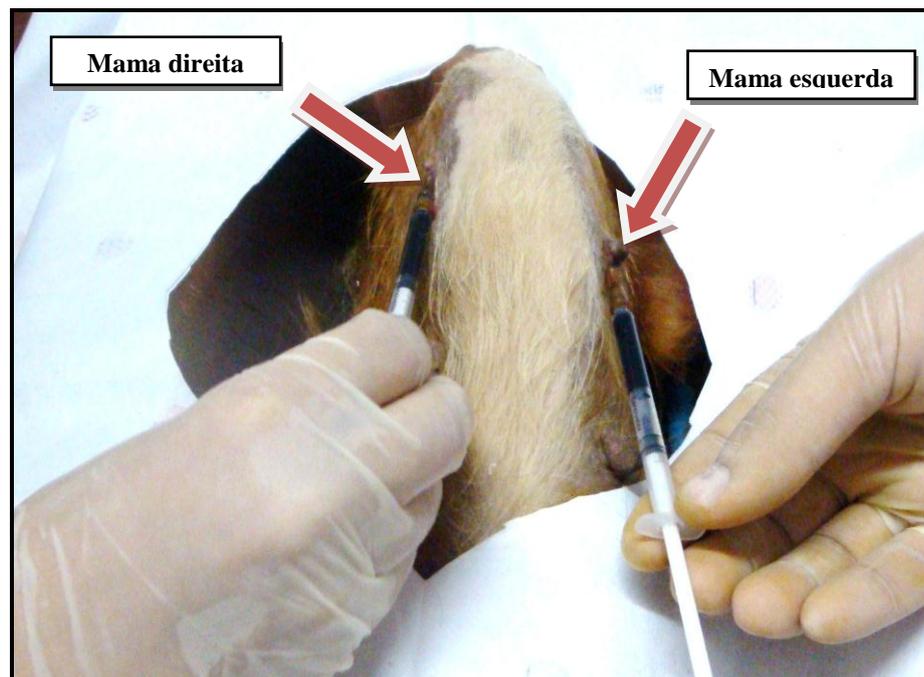


Figura 8- Injeções intradérmicas no sítio subareolar, nos pares das mamas anteriores da cadela, de corantes azul patente à direita e azul de metileno à esquerda. Tempo do experimento: 10 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

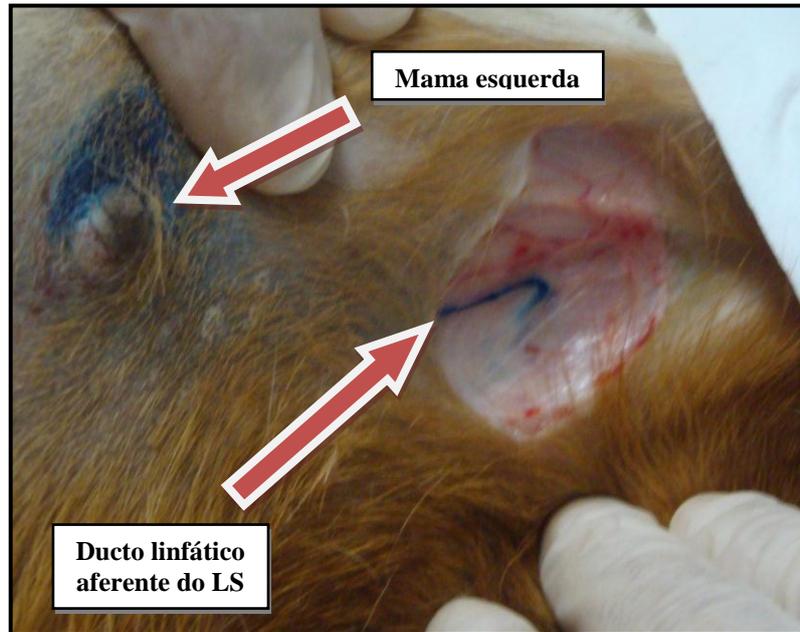


Figura 9- Localização de ducto linfático aferente do LS de mama esquerda, corado com azul de metileno. Tempo do experimento: 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figura 10- Localização radioguiada e contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-probe em LS da mama direita *in vivo*. Tempo 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figura 11- Localização radioguiada e contagem da captação da radiação com o uso do aparelho gama-probe em LS da mama esquerda *in vivo*. Tempo 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

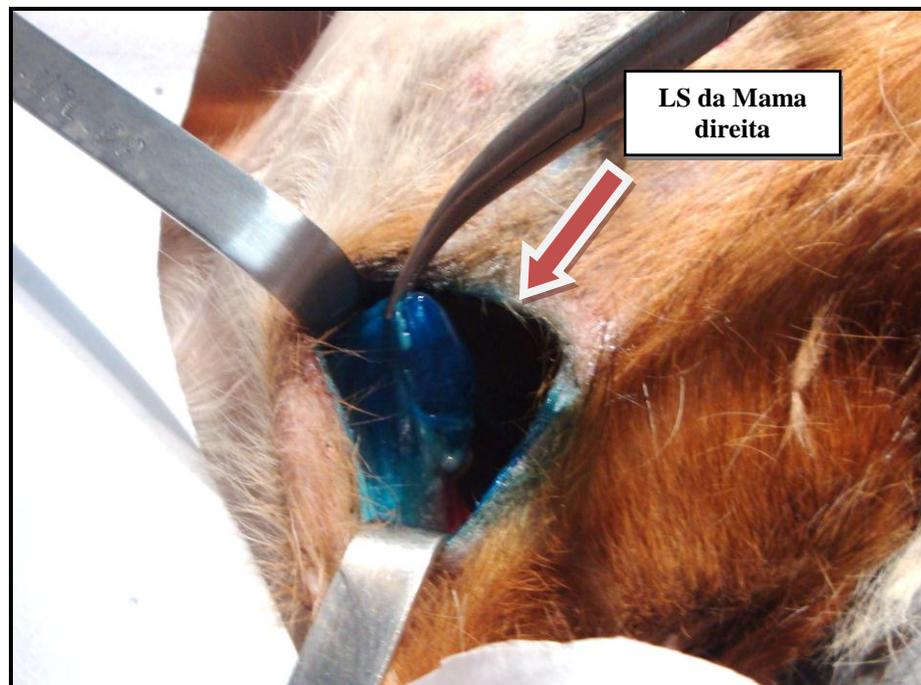


Figura 12- Localização do LS de mama direita corado com azul patente. Tempo 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

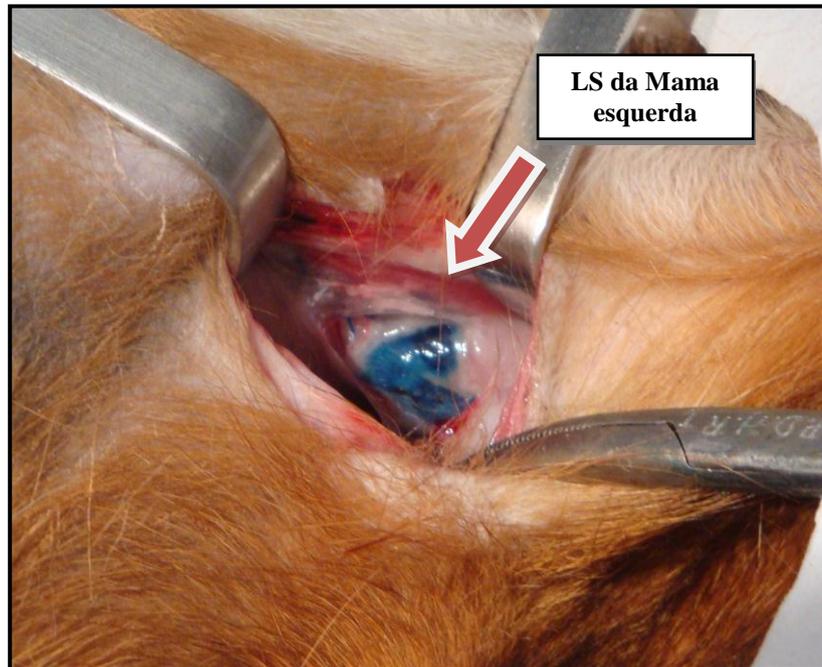


Figura 13- Localização do LS de mama esquerda corado com azul de metileno. Tempo 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figura 14- Contagem da captação da radiação de LS da mama direita corado com azul patente *ex vivo*. Tempo 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010



Figura 15- Contagem da captação da radiação de LS da mama esquerda corado com azul de metileno *ex vivo*. Tempo 20 minutos

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

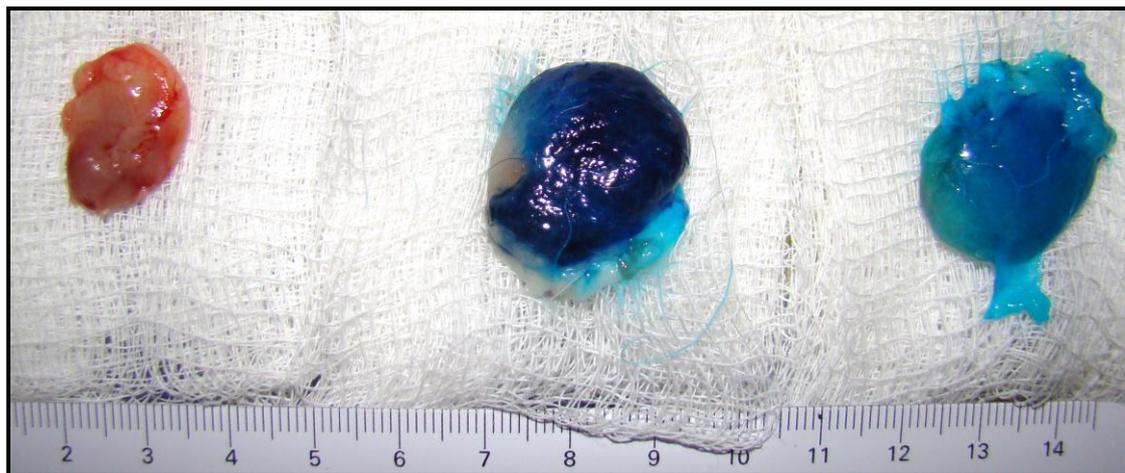


Figura 16- Linfonodo não corado, LS corado com azul de metileno e LS corado com azul patente, respectivamente, da esquerda para direita

Fonte: Dados da pesquisa, 2010

A verificação da radioatividade do LS excisado fora do campo cirúrgico (contagem *ex vivo*) e a comparação com a radiação do leito cirúrgico confirmam que foi realmente retirado o LS e que não existe outra fonte de radiação que possa justificar a continuação da pesquisa de outro LS. Foram registradas todas as taxas de radiação no sítio da injeção e na axila antes da incisão durante os quatro intervalos de tempo (a cada cinco minutos, totalizando 20 minutos), além da taxa de captação LS *in vivo* e *ex vivo* como também checada a radiação no leito da dissecação do LS para avaliar a possibilidade de outro(s) LS, sempre tendo como parâmetro “the background radioactivity” (radiação de controle).

Os dados tabulados quantificaram a intercessão das duas marcações e a concordância entre os métodos. Após realização da última contagem de radioatividade no leito axilar e excluída a possibilidade de outro LS, hemostasia rigorosa era realizada. O procedimento cirúrgico era finalizado com síntese e sutura de ferida operatória.

Após o experimento, o animal foi sacrificado na sala de cirurgia com injeção intravenosa em *bolus* de cloreto de potássio a 10 %. Depois de confirmada a morte pela ausência de sinais vitais, o animal foi armazenado em saco plástico adequado, colocado em refrigeração, por no mínimo duas horas, e enviado ao Centro de Zoonose.

3.7 Análise Estatística

Foi utilizado o Programa SPSS (Statistical Package for the Social Science). Os dados foram avaliados pelo teste de Mc Nemar e Coeficiente de Concordância de Kappa. Valores de P foram determinados, utilizando teste exato de Fisher. Valores de P menores e iguais a 0,05 foram aceitos como estatisticamente significantes.