

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Bernardo Nascimento Antunes

**DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO
PARA LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA
DO ILÍACO MEDIAL EM CÃES**

Santa Maria, RS
2020

PPGMV/UFSM, RS

ANTUNES, Bernardo Nascimento

Mestre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Bernardo Nascimento Antunes

**DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO
PARA LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA
DO ILÍACO MEDIAL EM CÃES**

Santa Maria, RS
2020

Bernardo Nascimento Antunes

**DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO PARA
LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA DO ILÍACO MEDIAL EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do Grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Veloso Brun

Santa Maria, RS
2020

Antunes, Bernardo
DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO
PARA LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA DO ILÍACO MEDIAL EM
CÃES / Bernardo Antunes.- 2020.
55 p.; 30 cm

Orientador: Maurício Brun
Coorientador: Daniel Müller
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2020

1. Cães 2. Laparoscopia 3. Linfadenectomia 4. Marcação
Linfática 5. Oncologia I. Brun, Maurício II. Müller,
Daniel III. Título.

Bernardo Nascimento Antunes

**DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO PARA
LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA DO ILÍACO MEDIAL EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para obtenção do
título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 27 de fevereiro de 2020:

Maurício Veloso Brun, Prof. PhD (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Carlos Afonso de Castro Beck, Prof. Dr. (UFRGS)

Marco Augusto Machado Silva, Prof. Dr. (UFG)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela bênção da vida e por um anjo da guarda sempre presente, pelas oportunidades abençoadas que tenho, assim como por todo o universo que me cerca.

Agradeço aos meus queridos pais Getúlio de Souza Antunes e Rosani Nascimento Antunes pelo amor, carinho, apoio e educação a mim dedicados, ao meu querido irmão Artur Nascimento Antunes pela sua presença em minha vida.

As minhas avós Olga Lopes do Nascimento e Zaida de Souza Antunes, que assim como meus tios e pais, torcem pelo meu sucesso apesar da saudade.

A Mônica Oliveira Rodrigues e Marilda Inácia Oliveira Rodrigues pela convivência desde o início da graduação, obrigado pela paciência, carinho e amor dedicados a mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Maurício Veloso Brun e a toda equipe SOMIV onde pude crescer profissionalmente e em especial aos colegas Daniel D. Guerra Segundo, Luis Fernando Pedrotti, Omar V. Gutierrez e Isadora Cassola. Obrigado pela experiência, amizade e auxílio que me proporcionaram em mais esta etapa.

Aos meus compadres Fabrício G. Godoy e Thais M. C. Walter pela linda afilhada Valentina e pelo companheirismo de sempre.

Agradeço em especial ao meu cão amigo Joli e a todos os animais que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO PARA LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA DO ILÍACO MEDIAL EM CÃES

AUTOR: BERNARDO NASCIMENTO ANTUNES

COORDENADOR: MAURÍCIO VELOSO BRUN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2020.

O sistema linfático serve de importante rota de transporte para células tumorais, sendo a avaliação histopatológica ou citológica dos linfonodos, em pacientes oncológicos, cruciais como fator prognóstico e auxiliar, na decisão da adoção de terapias adjuvantes. Por sua vez, o linfonodo ilíaco medial (MILN - *medial iliac lymph node*) por drenar vários tecidos da região posterior em cães, serve como um importante linfonodo para pesquisa de doença metastática. O objetivo do presente estudo foi comparar duas vias de marcação por azul de metileno do MILN e descrever o acesso laparoscópico na linha média com três portais para linfadectomia do MILN em cães. Para tanto, 24 cadelas hípidas, não castradas, foram divididas aleatoriamente em dois grupos de acordo com o local de aplicação do corante azul de metileno. A aplicação intradérmica de azul de metileno 0,25% no grupo torso (grupo T, n=12), na região glútea dorsal esquerda. No grupo poplíteo (grupo P, n=12), a administração foi intranodal percutânea, no linfonodo poplíteo esquerdo, guiada por ultrassonografia. Foram anotados os tempos de identificação do MILN marcado e de dissecação do MILN, bem como a impregnação deste linfonodo pelo corante. Na sequência todas as cadelas foram submetidas a ovariectomia laparoscópica (*Laparoscopic Ovariectomy* - LapOVE) ou ovariectomia videoassistida (*Laparoscopic-assisted Ovariohysterectomy* - LapOVH) utilizando os mesmos acessos portais. O tempo médio de identificação do MILN marcado foi de 4.0 ± 2.6 min., e o tempo médio de dissecação do MILN foi de 8.1 ± 2.8 min.. Não houve diferença estatística entre o grupo P e o grupo T quanto aos tempos de dissecação do MILN e de identificação do MILN marcado ($p \geq 0.396$). O acesso laparoscópico proposto permitiu a dissecação do MILN em todas as cadelas. Pelo acesso laparoscópico com três portais na linha média ventral, a biópsia do MILN esquerdo é viável e segura, mantendo qualidade aceitável para avaliação histopatológica na maioria das amostras. Tanto a injeção de azul de metileno intradérmica na região glútea dorsal como no linfonodo poplíteo proporcionam adequada marcação do MILN.

Palavras-chave: cães, laparoscopia, linfadectomia, marcação linfática, oncologia.

ABSTRACT

DIFFERENT SITES OF APPLICATION OF METHYLENE BLUE FOR LAPAROSCOPIC LYMPHADENECTOMY OF THE MEDIAL ILIAC IN DOGS

AUTHOR: BERNARDO NASCIMENTO ANTUNES

ADVISER: MAURÍCIO VELOSO BRUN

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 27, 2020.

The lymphatic system is an important pathway for dissemination of tumor cells. Lymphatic tissue histopathological or cytological evaluation guides prognosis and decision making on the use of adjuvant therapies in cancer patients. The medial iliac lymph node (MILN) receives lymph from of the hindlimbs in dogs. Thus, the MILN is important for local metastasis research. The purpose of this study was to compare two vias for methylene blue (MB) MILN staining and to describe a midline 3-port laparoscopic approach for MILN lymphadenectomy in dogs. Therefore, 24 healthy, intact bitches were randomly divided into two groups according to the via of application of methylene blue. Intradermal 0.25% MB was injected at the left dorsal gluteal region in the torso group (group T; n = 12). Percutaneous ultrasound-guided intranodal MB injection was given in the left popliteal lymph node (PLN), in dogs of the popliteal group (group P; n = 12). Time for colored MILN identification and time for MILN resection were recorded. Lymph node staining score was ranked in both groups. Subsequently, all bitches underwent laparoscopic ovariectomy (LapOVE) or laparoscopic-assisted ovariohysterectomy (LapOVH) using the same port placement as for the lymphadenectomy. Mean time for colored MILN identification was 4.0 ± 2.6 min.. Mean MILN excision time was 8.1 ± 2.8 min.. There was no significant difference between groups regarding time for MILN excision and identification of the marked MILN ($p \geq 0.396$). The laparoscopic approach purposed in this study allowed MILN dissection in all bitches. The laparoscopic approach with 3 ports in the midline is feasible for excisional biopsy of the left MILN. The procedure provided samples of acceptable quality for histopathological evaluation in most cases. Both dorsal gluteal area intradermal and ultrasound-assisted PLN methylene blue administrations provide successful MILN staining.

Keywords: dog, laparoscopy, lymphadenectomy, lymphatic marking, oncology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Imagens intraoperatórias do posicionamento dos portais laparoscópicos, marcação e linfadenectomia do MILN esquerdo. (A) Tricotomia e sítios de posicionamento dos portais. (B) Posicionamento dos portais. (C) Localização da região anatômica do MILN. (D) Início da marcação do MILN. (E) Início da dissecação do MILN. (F) Dissecação de um MILN intimamente envolto na artéria ilíaca circunflexa profunda.....48
- Figura 2 – Imagens intraoperatórias, pós operatórias e ultrassonográficas durante a marcação MILN esquerdo. (A) Tricotomia da região glútea caudal esquerda. (B) Posicionamento dos campos cirúrgicos durante aplicação do corante (C) Aplicação intradérmica do corante. (D) Reação pós operatória de hipersensibilidade ao corante aplicado intradérmico. (E) Tração e extensão do membro pélvico esquerdo e posicionamento do aplicador durante aplicação do corante no linfonodo poplíteo (F) Posicionamento do ultrassonografista para localização do linfonodo poplíteo e posicionamento do cateter intranodal. (G) Imagem ultrassonográfica da localização do linfonodo poplíteo. (H) Imagem ultrassonográfica do posicionamento do cateter intranodal. (I) Imagem ultrassonográfica do linfonodo poplíteo após aplicação do corante..... 49

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Sumarização dos dados das cadelas submetidas a aplicação do corante intradérmico no torso..... | 44 |
| Tabela 2 – Sumarização dos dados das cadelas submetidas a aplicação do corante intraparenquimatoso no linfonodo poplíteo..... | 45 |
| Tabela 3 – Sumarização dos dados dos MILNs coletados das cadelas submetidas a aplicação do corante intradérmico no torso. | 46 |
| Tabela 4 – Sumarização dos dados dos MILNs coletados das cadelas submetidas a aplicação do corante intraparenquimatoso no linfonodo poplíteo. | 47 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo A – Ficha de avaliação histopatológica..... | 56 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 11 |
| 2. ARTIGO | 16 |
| 2.1. RESUMO..... | 18 |
| 2.2. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2.3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 20 |
| 2.3.1. Animais | 20 |
| 2.3.2. Técnica Cirúrgica | 21 |
| 2.3.3. Marcação linfática | 22 |
| 2.3.4. Linfadenectomia | 24 |
| 2.3.5. Ovariectomia laparoscópica e ovariectomia videoassistida | 24 |
| 2.3.6. Avaliação histopatológica | 25 |
| 2.3.7. Análise estatística | 26 |
| 2.4. RESULTADOS..... | 26 |
| 2.4.1. Achados cirúrgicos | 26 |
| 2.4.2. Manejo pós operatório | 29 |
| 2.4.3. Avaliação histológica das amostras | 29 |
| 2.5. DISCUSSÃO..... | 30 |
| 2.6. CONCLUSÃO..... | 36 |
| 2.7. AGRADECIMENTOS..... | 37 |
| 2.8. REFERÊNCIAS..... | 38 |
| 2.9. LEGENDA DAS FIGURAS..... | 43 |
| 2.10. LEGENDA DAS TABELAS..... | 43 |
| 3. CONCLUSÃO | 50 |
| REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXO | 54 |
| ANEXO A – Ficha de avaliação histopatológica | 55 |

1. INTRODUÇÃO

A presença de metástase no sistema linfático está negativamente associada á sobrevida geral (POTANAS et al., 2015; CANADAS et al., 2019). Dessa forma um estadiamento oncológico acurado quanto ao envolvimento linfonodal é de suma importância para o prognóstico do paciente (STEFFEY et al., 2015; MAJESKI et al., 2017; FERRARI et al., 2018), implicando nas recomendações do plano cirúrgico e adjuvante (WORLEY, 2014; ANDERSON et al., 2015; BURGES & DEREGIS, 2019).

O sistema linfático pode ser dividido em um componente vascular coletor e um celular, sendo o primeiro é representado pelos capilares, vasos e ductos coletores linfáticos e o segundo, pelos linfonodos e tecidos linfáticos (BEZUIDENHOUT, 2013). Quanto ao linfocentro iliosacral, o mesmo compreende os linfonodos ilíacos mediais (MILN , do inglês *medial iliac lymph node*), os ilíacos internos (também chamados de hipogástricos) e os sacrais (POTANAS et al., 2015).

Para o MILN drenam os vasos linfáticos eferentes dos linfonodos cólicos esquerdos, inguinais profundos, inguinais superficiais, sacrais e ilíacos internos, os quais recebem a linfa dos membros pélvicos, ossos e músculos da pelve, músculos da parede abdominal caudal, aorta, meninges da medula espinhal, cólon, reto, ânus, vulva, vagina, bexiga, uretra, ureteres, próstata, túnica vaginal, cordões espermáticos, epidídimos e testículos (BEZUIDENHOUT, 2013).

No paciente oncológico, o linfonodo sentinela é aquele com maior probabilidade de receber a disseminação metastática de um tumor primário (WARLAND et al., 2014; MAJESKI et al., 2017). Contudo, a obstrução de vasos linfáticos pela drenagem de células tumorais metastáticas pode também desviar o fluxo linfático para linfonodos diferentes do sentinela, ocasionando em exame falso negativo para doença metastática (LAM et al., 2009). Nestes pacientes os padrões de drenagem linfática podem sofrer variações, estando elas diretamente relacionadas à ocorrência de metástases tumorais (SKOBE et al., 2001; STACKER et al., 2001) e ao grau de linfangiogênese do tumor (SCHOPPMANN et al., 2002). Com a formação de novos vasos linfáticos, amplia-se a rede de drenagem tumoral para linfonodos regionais possibilitando metástases a distância (PEREIRA, 2003; LUND & SWARTZ, 2010).

Na literatura veterinária, apesar de não ser reconhecido como o verdadeiro linfonodo sentinela da região posterior, estudos relatam tal ocorrência em cães com tumores na glândula do saco anal (MAJESKI et al., 2017), membros pélvicos (WORLEY, 2012) e escroto

(WARLAND et al., 2012). Além disso a ocorrência de doença metastática no MILN de cães com tumores na cadeia mamária (FERANTI et al., 2018), vesícula urinária (BURGESS & DEREGIS, 2019), membros pélvicos (WARLAND et al., 2012) e glândula do saco anal (POLLARD et al., 2015), também é descrita.

Em um estudo envolvendo 15 cães com adenocarcinoma de glândula do saco anal, o MILN foi identificado como linfonodo sentinela mais frequente (53% dos casos), junto a isso, em 33% dos pacientes o linfonodo sentinela foi identificado contralateral ao tumor primário (MAJESKI et al., 2017). A comunicação linfática entre o MILN direito e esquerdo também está descrita em cães saudáveis (MAYER, 2018). Outro estudo observa que em cães com mastocitoma, a amostragem anatômica não reflete com precisão quais linfonodos estão recebendo a drenagem linfática do tumor (WORLEY, 2012). Metástase em linfonodos distantes pode ocorrer em até 33% dos casos de melanomas em humanos (LIMA SÁNCHEZ, 2013), o que também é observado em 42% dos cães com mastocitoma avaliados por Worley (2012).

A drenagem de células neoplásicas de tumores de mama para o MILN, foi também relatada (FERANTI, 2018), podendo ser simultânea à drenagem pelos linfonodos axilar e inguinal superficial (PATSIKAS et al., 2006). Essa condição poderia explicar a presença de metástases torácicas, em animais que apresentem os linfonodos axilar e inguinal superficial livres de células neoplásicas (PATSIKAS et al., 2006). Vale ressaltar que a presença de metástase linfática em cadelas com tumor de mama está negativamente associada à sobrevida (CANADAS et al., 2019).

Em cadáveres de cães, Suami et al. (2008) comprovaram a drenagem linfática diretamente da parte caudal dorsal do torso para o MILN e linfonodo hipogástrico, o que também indica a possibilidade de disseminação metastática por esta via. Semelhante padrão de drenagem é descrito em humanos com melanoma na pele das costas. Na literatura esta descrito um padrão de drenagem, segundo eles inesperado, atravessando a parede corporal e chegando aos linfonodos sentinelas de áreas retroperitoneais para-aórticas e paralombares (UREN et al., 2003).

A presença de metástase no linfocentro iliosacral em cães com adenocarcinoma da glândula apócrina do saco anal é citada como comum, estando tal condição relacionada com menor tempo de sobrevida destes pacientes (POTANAS et al., 2015). Mesmo assim, não há estudos descrevendo melhora no prognóstico dos pacientes submetidos a linfadectomia. Entretanto, o procedimento é de suma importância para o estadiamento oncológico acurado e determinação do prognóstico do paciente (MAJESKI et al., 2017).

Em oncologia, é de grande importância identificar as alterações da drenagem linfática sob condições patológicas. Nesse contexto, a marcação linfática pré-operatória constitui uma das ferramentas para definição dessas alterações (PATSIKAS et al., 2006). A ultrassonografia pode servir como método efetivo para identificação da linfadenomegalia no linfocentro iliosacral, enquanto a tomografia computadorizada é mais específica na localização do mesmo (PALLADINO et al., 2016). Além da tomografia computadorizada e da ultrassonografia, a ressonância magnética é também uma ferramenta na identificação dos linfonodos iliosacrais. No entanto, pela complexidade anatômica do linfocentro iliosacral, tais técnicas não permitem identificação adequada do linfonodo a ser biopsiado na ausência de linfadenomegalia (PALADINO et al., 2016; ANDERSON et al., 2015; LLABRÉS-DÍAZ, 2004).

Mesmo na ausência de linfadenomegalia, a presença de doença metastática pode ocorrer (MAJESKI et al., 2017). Nesses casos, a punção percutânea do MILN guiada pelo ultrassom é ainda mais desafiadora, uma vez que o MILN se encontra junto a grandes vasos abdominais (LLABRÉS-DÍAZ, 2004). Apesar de a citologia aspirativa ser um método de avaliação do linfonodo sentinela, pode resultar em exame falso negativo (WORLEY, 2012). Dessa forma, afim de examinar linfonodos mais profundos, exames mais invasivos para colheita de biópsias são necessários. No intuito de induzir mínima morbidade e, dessa forma, aumentar a aceitabilidade do exame, a colheita do MILN pode ser realizada por abordagem laparoscópica (STEFFEY et al., 2015; LIM et al., 2017).

A marcação linfática intraoperatória com corante azul é utilizada para localização do MILN em cães (WORLEY, 2012; JUSTINO et al., 2014; FERANTI et al., 2018). Na medicina humana, o método mais comumente utilizado para mapeamento linfático é a aplicação de verde de indocianina (SPIGUEL et al., 2017), o que possibilita a avaliação da marcação através de até 10 mm de tecido vivo (GIOUX et al., 2010). Porém a técnica demanda o uso de fonte de luz infravermelha afim de excitar o fluoróforo (marcador) (SPIGUEL et al., 2017) Dessa forma, sua aplicação na videocirurgia veterinária torna-se restrita, por exigir equipamentos específicos (GIOUX et al., 2010).

A linfocintilografia também é descrita no mapeamento intraoperatório do MILN (WORLEY, 2012). Essa técnica baseia-se na aplicação peritumoral subcutânea ou intratumoral de um coloide de enxofre marcado com tecnécio, para detecção do linfonodo sentinela com auxílio de uma sonda de radiação gama (COX et al., 2000).

O azul de metileno é reconhecido como um corante efetivo e de baixo custo para marcação linfática em humanos nos países em desenvolvimento (EAST et al., 2009). A associação do corante azul na linfocintilografia pode minimizar os resultados falso-negativos

de cirurgiões que se encontram na parte inicial da curva de aprendizado para estas técnicas (COX et al., 2000).

Dos corantes azuis mais comumente usados na marcação linfática, destacam-se o tecnício 99m (CABRAL & VOLKWEIS, 2017), o azul patente (CASSALI et al, 2018), o azul de isosulfan e o azul de metileno (WORLEY, 2012). Para aplicação intranodal de azul de metileno em cães indica-se dose de $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, na concentração de 1% (ENWILLER et al., 2003), enquanto que para a aplicação intradérmica, é utilizado um volume de 0,5 e 1ml para cães de até 15kg e acima de 15kg, respectivamente (SOUZA et al., 2016). A aplicação de azul de metileno intrauterina e no parênquima do linfonodo poplíteo para marcação do MILN em cães também foi relatada (JUSTINO et al., 2014; FERANTI et al., 2018; ENWILLER et al., 2003).

O extravasamento extranodal de contraste pode ser causa do mau posicionamento da agulha no momento da injeção ou até mesmo, ruptura de vasos linfáticos secundária a injeção rápida de conteúdo no parênquima do linfonodo. Recomenda-se para a injeção intranodal de iohexol em linfonodo poplíteo em cães com aproximadamente 10kg, uma taxa de administração de 2ml/min (NAGANOBU et al., 2006). A ultrassonografia pode servir como instrumento guia para a técnica (NAGANOBU et al., 2006; CHUN et. al., 2009). Para tanto, são indicadas as sondas de alta frequência ou probes lineares variando entre 7 MHz (CHUN et al., 2009) a 10 MHz (HENDERSON et al., 2003).

Estudos prévios relatam a identificação do ducto torácico em cães pela injeção intranodal de corante no linfonodo poplíteo, por acesso cirúrgico de 2-4 cm (ENWILLER, et al., 2003; STEFFEY & MAYHEW, 2017). Afim de manter a integridade dos vasos linfáticos aferentes e eferentes com essa técnica, recomenda-se evitar a dissecação da gordura perinodal craniolateral (STEFFEY & MAYHEW, 2017).

Para linfadenectomia laparoscópica do MILN em cães utilizando o acesso ventral com três portais, é utilizado cefalodeclive de 15° para inspeção inicial. Em seguida, realiza-se lateralização de 30° de inclinação da mesa para o lado contra lateral ao MILN a ser localizado, permitindo a abordagem bilateral sem o reposicionamento dos portais (LIM et al., 2017). Pelo acesso laparoscópico lateral, inevitavelmente é necessário o reposicionamento dos portais para linfadenectomia do MILN contralateral (STEFFEY et al., 2015). Em ambas as técnicas, os autores supracitados não utilizaram a marcação linfática para localizar o MILN. Em contrapartida, definiram como sítio anatômico para busca, a área caudal à artéria ilíaca circunflexa profunda e entre a artéria ilíaca externa e a veia testicular.

Definições quanto ao local de marcação, tipos de marcadores e o desenvolvimento de técnicas de linfadenectomia, tal como proposto no presente estudo, são muito importantes para aplicação clínica em determinadas condições oncológicas. Somado a isso, cabe ressaltar que neoplasmas que drenam para o linfocentro iliosacral incluem carcinoma de células de transição (BURGESS & DEREGIS, 2019), carcinoma tubulopapilar mamário (FERANTI et al., 2018), adenocarcinoma da glândula do saco anal (POLLARD et al, 2015) e mastocitoma (WARLAND et al., 2012), sendo que em todos esses estudos citados o MILN apresentava células tumorais.

Nesse sentido, a presente investigação científica foi conduzida com o objetivo de avaliar quanto à aplicação de azul de metileno intradérmico na região glútea dorsal ou no parênquima do linfonodo poplíteo guiado por ultrassonografia, definindo se existe um sítio mais adequado para marcação do MILN em cadelas híginas. Junto a isso, também foi avaliado o emprego da técnica de acesso laparoscópico com três portais na linha média para linfadenectomia do MILN, técnica previamente não testada para esse fim.

2. ARTIGO

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

Periódico: The Journal of Veterinary Medical Science (ISSN 0916-7250)

**DIFERENTES SÍTIOS DE APLICAÇÃO DE AZUL DE METILENO PARA
LINFADENECTOMIA LAPAROSCÓPICA DO ILÍACO MEDIAL EM CÃES**

Full paper

Surgery

Running head: MARCAÇÃO E LINFADENECTOMIA ILIACO MEDIAL EM CÃES

Diferentes sítios de aplicação de azul de metileno para linfadenectomia laparoscópica do ilíaco medial em cães

Bernardo N. ANTUNES¹ and Maurício V. BRUN^{1,*}

¹Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, 97105-900, Camobi, Rio Grande do Sul, Brasil

*Autor Correspondente: Dr. Maurício V. Brun. Pesquisador do CNPq/Brasil (305876/2018-0).

Fone/Fax: +55-54-99962-7707. E-mail: mauriciovelosobrun@hotmail.com

2.1.RESUMO

Os objetivos desse estudo foram comparar duas vias de marcação do linfonodo ilíaco medial (MILN) e descrever o acesso laparoscópico na linha média com três portais, para linfadenectomia do MILN em cães. Vinte e quatro cadelas híginas, não castradas, pesando entre 12.7 ± 2.6 kg foram divididas aleatoriamente em dois grupos de acordo com o local de aplicação do corante azul de metileno. A aplicação intradérmica, do corante no grupo torso (grupo T) (n=12) foi realizada na região glútea dorsal esquerda, e no grupo poplíteo (grupo P) (n=12) percutânea intranodal no linfonodo poplíteo, guiada por ultrassom. Na sequência, as pacientes foram castradas utilizando os mesmos acessos portais. Os tempos de identificação do MILN marcado e de dissecação dos MILN não demonstraram diferença estatística ($p \geq .396$). Em todas as cadelas o MILN esquerdo pôde ser dissecado pelo acesso laparoscópico com três portais na linha média ventral, mantendo qualidade aceitável da amostra para avaliação histopatológica em 23/24 animais. A linfadenectomia do MILN esquerdo é viável em cadelas pelo acesso laparoscópico com três portais na linha média ventral. Ambas as vias de administração do azul de metileno são adequadas para a marcação do MILN.

PALAVRAS CHAVE: Biópsia, Cão, Cirurgia Minimamente Invasiva, Laparoscopia, Mapeamento Linfático

2.2.INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm representado a importância da identificação da doença metastática no sistema linfático [2, 12, 29, 35]. Essa condição é importante no prognóstico e afeta as recomendações do plano cirúrgico e adjuvante [8, 35].

O linfonodo ilíaco medial (MILN) faz parte do linfocentro iliosacral o qual recebe a linfa de neoplasias do abdômen caudal, períneo, pelve e membros caudais [5]. Embora o MILN não seja destacado como o verdadeiro sentinela dessas regiões, a drenagem de células neoplásicas de tumores de mama [11], da vesícula urinária [8], do membro posterior [34] e glândula do saco anal [24], tem sido descrita. Além disso, pode haver o desvio do fluxo linfático quando há obstrução deste por células tumorais, podendo resultar em exame falso negativo para doença metastática [16, 35].

Em cães, a drenagem linfática diretamente da pele da região glútea dorsal para o MILN foi constatada, sendo este o linfonodo sentinela dessa região e o único pelo qual a linfa passa para chegar á circulação venosa [30]. Como exame de triagem para avaliar linfadenomegalia do MILN, a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, são efetivas [2, 19, 23]. Mesmo assim os linfonodos regionais, quando normais à palpação e ao exame de imagem, podem abrigar metástase [11, 12, 13]. Portanto, para o diagnóstico definitivo são necessárias outras ferramentas diagnósticas como a avaliação citológica ou histopatológica [2, 12]. A análise histopatológica é a mais indicada para avaliação dos linfonodos não aumentados ou de localização profunda [13].

Um estudo em cães com mastocitoma concluiu que o linfonodo sentinela não foi o linfonodo regional em 42% dos casos, demonstrando que a amostragem anatômica pode não refletir com precisão quais linfonodos estão recebendo a drenagem linfática do tumor [35]. Outro estudo envolvendo 15 cães com adenocarcinoma de glândula do saco anal, identificou o MILN como linfonodo sentinela mais frequente (53% dos casos), com taxa de 33% de

metástase em linfonodo sentinela contralateral ao tumor primário [22]. A comunicação linfática entre o MILN direito e esquerdo também foi relatada em cães [20]. Dessa maneira, a inspeção bilateral dos MILNs torna-se importante.

A punção percutânea do MILN guiada pelo ultrassom é desafiadora devido a sua localização anatômica junto a grandes vasos abdominais [19]. Dessa forma, a biópsia do MILN requer abordagem invasiva. Abordagens laparoscópicas ao MILN foram desenvolvidas no intuito de reduzir a morbidade e aumentar a aceitação do exame por proprietários [18, 29].

A marcação do MILN em cães pode ser obtida pela injeção de azul de metileno intrauterino [11,15] e no linfonodo poplíteo [10]. Contudo, não foram encontrados estudos comparando outras vias de aplicação, tempo de identificação do MILN marcado e grau de coloração. Os objetivos do presente estudo foram comparar o tempo de identificação do MILN marcado e o grau de coloração do MILN em cães, após injeção de azul de metileno via intradérmica na região glútea dorsal ou no parênquima do linfonodo poplíteo, assim como descrever o acesso laparoscópico na linha média com três portais, para linfadenectomia do MILN em cães.

2.3.MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi feito no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU-UFSM) com prévia aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo nº. 5792160119.

Animais

Vinte e quatro fêmeas caninas não castradas, pesando entre 7,6 e 17,2 kg, com escore de condição corporal (ECC) entre 4 e 6 de acordo com Baldwin et al. [4], encaminhadas ao HVU-UFSM para castração eletiva, foram aleatoriamente distribuídas nos grupos torso (grupo T) e poplíteo (grupo P). Os animais foram submetidos a exame físico completo e

avaliação hematológica (hemograma, contagem plaquetária e bioquímica sérica hepática e renal). A higidez diante de tais exames e a prévia autorização do tutor para execução do procedimento cirúrgico, foram utilizados como critério de inclusão.

Após jejum de sólidos de 12 horas e hídrico de 8 horas, os animais foram pré medicados com cloridrato de tramadol (4 mg/kg, intramuscular (IM) cloridrato de tramadol[®] 100 mg/2 ml, Teuto, Brasil). A indução anestésica foi realizada com propofol (4 mg/kg, intravenoso (IV), Diprivan1%[®], Cristália, Brasil), sendo mantida com inalação de isoflurano (Isoforine[®], Cristália, Brasil) vaporizado em oxigênio a 100%. Analgesia intraoperatória foi mantida com infusão contínua de citrato de fentanila (5 µg/kg/h, IV, Fentanest[®], Cristália, Brasil). Utilizou-se quimioprofilaxia antimicrobiana com cefalotina (30 mg/kg, IV, Cefalotina sódica 1g[®], ABL, Brasil) 30 min antes da laparoscopia. Realizou-se tricotomia prévia, desde o processo xifoide até a borda do púbis, estendendo-se bilateralmente até a cadeia mamária (Fig. 1A). Uma área de aproximadamente 7x7 cm sobre o sítio de aplicação do corante, foi também tricotomizada (Fig. 2A). Os animais participaram simultaneamente de outro estudo envolvendo endoscopia digestiva alta (EDA). Após a coleta dos dados, as pacientes foram posicionadas em decúbito dorsal. A drenagem da urina era realizada pela compressão vesical.

Técnica cirúrgica

Para a realização da linfadenectomia e da castração em todas as cadelas, foi utilizado o acesso laparoscópico com três portais em linha média, conforme descrito em outros estudos [32, 33]. Todos os procedimentos laparoscópicos foram realizados pelo mesmo cirurgião (MVB).

Foi posicionado, pela técnica aberta, o primeiro portal (11 mm, Karl Storz Endoscopy[®], Tuttlingen, Germany) entre o terço cranial e o médio do espaço entre a cicatriz umbilical e o púbis. Nesse acesso utilizou-se endoscópio de 10 mm (10 mm × 33,5 cm 0°, Karl Storz Endoscopy[®], Tuttlingen, Germany). Através desse portal foi estabelecido e

mantido o pneumoperitônio com CO₂ medicinal (pressão máxima de 8 mmHg, fluxo máximo de 1,5 L/min), utilizando um insuflador automático (Storz Endoflator[®], Tuttlingen, Germany).

Após a inspeção abdominal, caso a vesícula urinária ainda se encontrasse repleta, a mesma era drenada mediante sonda uretral 8 Fr. Na sequência, o segundo portal (6 mm, Karl Storz Endoscopy[®], Tuttlingen, Germany) foi posicionado ligeiramente cranial a cicatriz umbilical e, o terceiro (11 mm, Karl Storz Endoscopy[®]), entre o primeiro e a borda cranial do púbis (Fig. 1A e Fig. 1B).

O decúbito foi modificado para lateral direito. Para inspeção do abdômen caudal, foram passadas duas pinças laparoscópicas de apreensão e dissecação tecidual, uma (Pinça Kelly, 5 mm × 43 cm, Karl Storz[®] Endoscopy) através do segundo portal e outra (Pinça Kelly, 5 mm x 36 cm, Edlo, Exatech) através do terceiro portal, com redutor para 5 mm. As artérias ilíacas externa e circunflexa profunda esquerdas eram identificadas (Fig. 1C). Em caso de necessidade de maior afastamento das vísceras sobre a região a ser dissecada, procedeu-se Trendelenburg com 11° de inclinação. Na sequência, foi iniciada a marcação linfática, simultaneamente à inspeção direta da superfície retroperitoneal da região do MILN esquerdo (Fig. 1D). O mesométrio disposto sobre tal região foi previamente divulsionado quando se apresentava espesso por tecido adiposo. Não havendo a identificação do MILN ao término da aplicação do corante, o retroperitônio imediatamente caudal a artéria ilíaca circunflexa profunda e medial a artéria aorta foi cuidadosamente divulsionado afim de identificar o MILN, utilizando-se as pinças Kelly.

Marcação linfática

Em ambos os grupos, o azul de metileno 1% (0,5 mg/kg, Injectcenter Manipulação de Produtos Farmacêuticos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) diluído em NaCl 0,9% para 2,5 mg/m^l, foi utilizado como corante.

No grupo T o corante foi aplicado intradérmico, aproximadamente 1 cm cranial à crista ilíaca esquerda, distribuído entre 5 a 10 pontos, aproximadamente 8 mm distantes entre si. Uma seringa de 5 ml acoplada a uma agulha de insulina foi utilizada para esse fim (Fig. 2B e Fig. 2C).

No grupo P o corante foi aplicado via percutânea no parênquima do linfonodo poplíteo esquerdo, utilizando uma seringa de 5ml conectada a um extensor de 60 cm, acoplado a um mandril de cateter calibre 24. Nesse grupo, dois indivíduos foram necessários para a aplicação do corante. Um tracionou o membro ventralmente, em extensão e, com a outra mão, pressionou o embolo da seringa para injeção do corante a uma taxa de aproximadamente 1 ml/min (Fig. 2E). O segundo, identificou o linfonodo poplíteo mediante exame ultrassonográfico, com transdutor linear de 12 MHz (Mindray Z6vet Ultrasound®, Mindray, São Paulo, SP, Brasil) e inseriu neste o cateter guiado por ultrassonografia (Fig. 2F e Fig. 2G).

Para ambos os grupos, foi aplicada apenas a metade do volume total de solução corante quando obtida marcação do MILN ou de seus vasos linfáticos previamente a essa dose, afim de se minimizar riscos de reação adversa e determinar uma dose mínima de corante necessária para a marcação do MILN.

Após a linfadenectomia, cada MILN foi fotografado utilizando uma câmera fotográfica digital (Sony, DSC-W180), com resolução de 3642 x 2056 pixels, sob luz fluorescente a uma distância fixa de 8 cm.

A coloração do MILN foi classificada pelo cirurgião durante a linfadenectomia e no pós-cirúrgico por três avaliadores inconscientes aos tratamentos através das imagens digitalizadas. A classificação da coloração óptica do MILN para o azul de metileno, foi definida como previamente descrito com modificações [10, 28]: grau 0= coloração ausente; grau 1= leve coloração azul; grau 2= coloração ideal óbvia de azul. Na avaliação pós-

operatória, para cada MILN foi considerado o grau mediano recebido pelos avaliadores do pós-operatório.

Foram anotados o tempo de identificação do MILN marcado, compreendido entre o início da aplicação do corante até a identificação do MILN marcado pelo corante, o tempo de dissecação do MILN e o tempo de castração. O número de linfonodos e a posição de cada linfonodo em relação à artéria ilíaca circunflexa profunda, foram também anotados. Semanalmente, durante nove semanas, imagens do sítio de injeção do corante foram solicitadas aos proprietários através de contato telefônico.

Linfadenectomia

Após identificado o MILN esquerdo, foi iniciada sua dissecação. Os tecidos moles e os vasos anexados ao MILN foram dissecados de forma romba, enquanto com uma das pinças, o linfonodo era tracionado para longe dos grandes vasos, incluindo as artérias ilíacas externa e circunflexa profunda esquerdas. A dissecação foi realizada inicialmente no aspecto medial do linfonodo (Fig. 1E), expandindo-se no sentido caudal e/ou cranial, afim de separar completamente o MILN dos tecidos e vasos circundantes.

Para hemostasia, quando necessário, foi utilizada uma torunda de gaze umedecida, passada pelo redutor do terceiro portal ou cautelosamente aplicada a eletrocoagulação com uma pinça laparoscópica bipolar (5mm x 45cm, Powerblade®, LINA Medical, Glostrup, Dinamarca). Após dissecados, os MILNs foram posicionados no interior do redutor do terceiro portal, e exteriorizados em conjunto.

Ovariectomia laparoscópica e ovariohisterectomia videoassistida

Após a linfadenectomia, todas as cadelas foram castradas, de acordo com técnicas previamente descritas para ovariectomia laparoscópica (Lap-OVE) e ovariohisterectomia videoassistida (Lap-OVH) [7]. Nessa etapa, o cefalodeclive, quando presente, foi desfeito. As

cadelas com histórico de uso de progestágeno, bem como as que apresentaram alteração uterina durante a laparoscopia, foram submetidas a Lap-OVH.

Previamente a remoção dos portais, a cavidade abdominal foi brevemente insuflada e inspecionada, afim de garantir quanto à inexistência de qualquer sangramento intra-abdominal. Na sequência, os portais foram removidos e o CO₂ drenado da cavidade. A síntese das feridas de acesso foi realizada com poliglactina 910 2-0, com sutura em colchoeiro em cruz na musculatura abdominal e no tecido subcutâneo. Na pele foram aplicados pontos em padrão colchoeiro horizontal com náilon monofilamentar 4-0. A analgesia pós-operatória foi mantida com dipirona sódica (25 mg/kg, oral, três vezes ao dia por quatro dias) e cloridrato de tramadol (4 mg/kg, oral, três vezes ao dia por três dias). Para as cadelas submetidas a EDA, também foi prescrito omeprazol (1mg/kg, oral, uma vez ao dia por cinco dias). O retorno em sete dias para reavaliação e remoção dos pontos de pele foi solicitado.

Avaliação histopatológica

Cada MILN extirpado foi imerso em formalina 10% e encaminhado para avaliação histológica de trauma mecânico causado durante a dissecação. Após dimensionamento da amostra, cada MILN foi bissectado longitudinalmente e ambas as superfícies de corte avaliadas com a coloração de eosina e hematoxilina, utilizando critérios previamente descritos [18, 29]. Um único patologista, inconsciente ao tratamento de cada espécime, realizou todas as avaliações. De acordo com trabalhos prévios [18, 29], artefatos histológicos foram classificados como centrais (artefatos de pressão/pinçamento/esmagamento em áreas centrais do linfonodo) ou periféricos (artefatos de pressão/pinçamento/esmagamento em áreas perinodais, cápsula e córtex/paracortex do linfonodo). Tais artefatos receberam escores de acordo com o seguinte critério: 0= ausência de artefato; 1= deformação mínima/marginal; 2= esmagamento suave; 3= esmagamento moderado; 4= esmagamento severo. Quando diferentes áreas dentro de uma região periférica ou central de um MILN receberam uma série de escores,

o pior escore recebido foi atribuído a este linfonodo como escore geral. A área de superfície bissectada de cada MILN foi calculada pela fórmula matemática da área de uma elipse ($\pi*r1*r2$).

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa Action Stat, versão 3.6.331.450 (Estatcamp, São Carlos, SP, Brasil). O teste Kalmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição normal dos dados, sendo relatados como valores médios com a variabilidade expressa em desvio padrão quando distribuídos normalmente, e relatados como valores medianos com intervalos quando não apresentavam distribuição normal. Para comparação do tempo de identificação do MILN marcado, do tempo de dissecação do MILN, do tempo de castração, do comprimento dos MILNs, da largura dos MILNs e do peso dos pacientes, entre os grupos, foi utilizado o teste *t* de Student. Para comparação do grau de coloração do MILN entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A significância estatística foi estabelecida como $p < .05$

2.4.RESULTADOS

O peso corporal médio das cadelas foi de 12.7 ± 2.6 kg, sendo menor ($p = .00029$) para o grupo P (11 ± 2.0 kg) em relação ao grupo T (14.5 ± 1.9 kg). O escore de condição corporal mediano foi 5, (variação, 4-6) e a idade mediana foi de 2.2 anos (variação, 0.4-9.4 anos).

Achados cirúrgicos

Em todas as cadelas o MILN pode ser identificado e colhido através da técnica proposta. Nenhum animal necessitou de conversão da técnica laparoscópica para laparotomia aberta, nem mesmo do aumento da pressão intra abdominal (IAP).

A sondagem vesical foi necessária em um animal do grupo T e dois do grupo P. Para a linfadenectomia, o cefalodeclive não foi necessário em 8/13 cadelas submetidas a EDA (quatro animais de cada grupo), o qual foi necessário para as cadelas não submetidas a EDA prévia. Portanto a visualização das estruturas e o espaço de trabalho para realização das técnicas laparoscópicas não foi prejudicada pela EDA prévia.

A abordagem medial ao corno uterino esquerdo para acessar o MILN esquerdo, ao contrário da lateral, torna-se mais difícil, uma vez que o corno uterino sobrepõe o espaço de trabalho. Apenas em 2/12 animais do grupo T e 1/12 animal do grupo P o MILN esquerdo pôde ser identificado sem incidir o retroperitônio. Nos animais que exigiram a dissecação do tecido adiposo retroperitoneal (21/24), o momento exato da marcação do MILN não pôde ser avaliado.

Em todas as cadelas o MILN esquerdo foi localizado lateral a artéria ilíaca externa esquerda e ureter esquerdo, medial ao mesométrio esquerdo e, em 18/24 cadelas, ligeiramente caudal a artéria ilíaca circunflexa profunda esquerda. Em 2/24 cadelas o MILN foi encontrado cranialmente a artéria ilíaca circunflexa profunda e, em 3/24 cadelas o linfonodo estava sobre ela. Em 1/24 cadela, a artéria ilíaca circunflexa profunda cruzava o interior do MILN (Fig. 1F), sendo necessária o rompimento do linfonodo para sua liberação. Em 2/12 cadelas do grupo T foram encontrados dois MILNs.

Em 1/12 animal de cada grupo a marcação do MILN não foi identificada na avaliação intraoperatória, sendo os mesmos classificados como grau 0. O mesmo ocorreu na avaliação pós-operatória porém, no grupo P a classificação grau 0 não correspondeu ao mesmo MILN classificado como grau 0 na avaliação transoperatória (Tabela 2).

Em 3/12 cadelas do grupo T, a marcação dos vasos linfáticos foi vista previamente a aplicação da metade do volume total estipulado, para estes animais, foi aplicado somente a metade do volume total estipulado. Nas avaliações intraoperatória e pós-operatória, os

respectivos MILNs receberam escore 2 em 2/3 cadelas e escore 1 em 1/3. Para o restante das cadelas (9/12) foi aplicado o volume total de corante.

Quanto à classificação intraoperatória da coloração dos MILNs no grupo T, 4/12 MILNs foram classificados com grau 1 e 7/12 MILNs foram classificados como grau 2; no grupo P, 2/12 MILNs foram classificados com grau 1 e 9/12 MILNs foram classificados com grau 2.

Quanto a classificação pós-operatória da coloração dos MILNs no grupo T, 5/12 MILNs foram classificados com grau 1 e 6/12 MILNs foram classificados como grau 2. No grupo P, 1/12 MILN foi classificado com grau 1 e 10/12 MILNs foram classificados com grau 2. Não ocorreu diferença estatística entre os grupos P e T quanto ao grau de coloração do MILN ($p \geq .616$).

Em 22/24 (91.7%) cadelas ocorreu a marcação do MILN. O tempo médio de identificação do MILN marcado para os 22 MILNs marcados foi de 4.0 (± 2.6) min, sendo 3.9 (± 2.2) min para grupo T e 4.0 (± 3.0) min para grupo P ($p = .59$). O tempo médio de dissecação do MILN foi de 8.1 (± 2.8) min, sendo 8.6 (± 3.2) min para grupo T e 7.6 (± 2.3) min para grupo P (Tabela 1 e 2) ($p = .39$). O comprimento e a largura média dos MILNs extirpados nos grupos P e T, foram de 17.5 (± 5.6) mm, 8.8 (± 2.8) mm, 17.4 (± 7.7) mm e 8.6 (± 3.2) mm, respectivamente (Tabela 3 e 4). Não ocorreu diferença estatística entre os grupos P e T quanto ao comprimento e a largura dos MILNs ($p \geq .83$).

O tempo de castração foi avaliado em 21/24 animais, onde 9/21 foram submetidas a Lap-OVE apresentando uma média de 25.7 ± 4.6 min e 12/21 foram submetidas a Lap-OVH apresentando uma média de 32.8 ± 8.9 min. O tempo de castração foi significativamente menor para a Lap-OVE ($p = .041$). Em nenhum dos animais houve hemorragia profusa durante os procedimentos de linfadenectomia e castração. Somente em um animal, a eletrocoagulação bipolar foi empregada na dissecação do MILN sendo, em outros 2 animais,

utilizada apenas uma torunda de gaze para drenagem e hemostasia do leito de dissecação do MILN.

Manejo pós-operatório

Todas as cadelas recuperaram da anestesia sem intercorrências. Não foi observada qualquer complicação pós-operatória, incluindo infecção, inflamação ou hemorragia do sítio cirúrgico até a remoção dos pontos de pele. Em 18/24 cadelas (6 do grupo P e 12 do grupo T), pode ser realizado o acompanhamento do local de aplicação do corante. No grupo T, a pigmentação azul no sítio de aplicação do corante, desapareceu dentro de nove semanas. No grupo P, em 2/6 cadelas acompanhadas ocorreu a pigmentação azul do sítio de aplicação do corante, desaparecendo dentro de três semanas.

No grupo T, 3/12 cadelas apresentaram reação de hipersensibilidade no local de aplicação do corante, duas delas cursando com eritema e ulceração cutânea (Fig. 2D) e outra apenas com descamação superficial. Para as duas cadelas com ulceração cutânea, foi prescrito o uso de roupa cirúrgica por mais dez dias e higienização diária da ferida com NaCl 0,9%, ocorrendo a cicatrização completa da ferida dentro de dez dias. Uma delas cursou com prurido intenso, sendo também prescrito cloridrato de hidroxizina (1 mg/kg, oral, a cada oito horas por cinco dias). Em 6/12 cadelas acompanhadas do grupo P, nenhuma reação cutânea foi identificada no local de aplicação do corante.

Avaliação histológica das amostras

Com base na localização anatômica, todas as amostras das 24 cadelas foram confirmadas histologicamente com MILNs. Em 23/24 (95.8%) cadelas, as amostras de MILN foram consideradas adequadas para diagnóstico, exceto um MILN do grupo T, o qual devido ao tamanho e incidência de corte não foi possível avaliar a região medular. Para os MILNs do grupo T e P, o escore mediano de artefatos centrais foi 1 (variação, 0-2) e 0,5 (variação, 0-2), respectivamente. Já o escore mediano de artefatos periféricos foi 2 (variação, 2-3) e 3

(variação, 2-3) para os MILNs do grupo T e P, respectivamente. A porcentagem mediana da área superficial afetada por artefatos histológicos foi de 10% (variação, 5-30%) e 20% (variação, 5-30%) para os MILNs do grupo T e P, respectivamente (Tabela 3 e 4).

2.5.DISSCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas de biópsia do MILN pode auxiliar em futuras pesquisas que buscam estudar o comportamento de tumores que cursam com metástase no MILN [8, 11, 24, 34]. Igualmente, acreditamos que futuras pesquisas do comportamento de tumores envolvendo a região glútea dorsal de cães também podem ser beneficiadas pelo uso da técnica laparoscópica para linfadenectomia MILN.

Com a paciente em decúbito lateral esquerdo a região retroperitoneal do MILN direito pôde ser bem visualizada durante a castração, utilizando o acesso laparoscópico com três portais na linha média. Contudo, avaliar a viabilidade desse acesso para a marcação e dissecação do MILN direito, implicará em novos estudos. Mesmo assim acredita-se que a técnica proposta poderia ser realizada de forma similar, alterando o decúbito do paciente para o lateral esquerdo ou então dissecando-se a raiz do mesentério e o peritônio mantendo-se o mesmo decúbito. O acesso laparoscópico lateral com três portais, descrito por Steffey et al. [29], permite a abordagem do MILN ipsilateral, exigindo o posicionamento adicional dos portais para acessar o MILN contralateral. Já o acesso laparoscópico ventral com três portais, descrito por Lim et al. [18], permite a abordagem bilateral do MILN em cães machos.

O reduzido tempo de dissecação do MILN esquerdo obtido em nosso estudo (8.1 ± 2.8 min) pode ter sido favorecido pela marcação prévia do MILN e pela disposição dos portais, a qual permitiu satisfatória manipulação do instrumental cirúrgico e inspeção da cavidade abdominal. Em cães, o tempo de dissecação mediano descrito para a técnica de acesso lateral, foi de 14.5 min (variação, 9-22 min) para 5 MILNs esquerdos [29], já para a técnica de acesso

ventral, o tempo médio de dissecação previamente descrito para 12 MILNs esquerdos foi de 9.8 ± 2.5 min [18].

Embora tenhamos realizado a marcação do MILN, a porcentagem de área superficial afetada por artefatos histológicos foi consideravelmente maior quando comparado a estudos prévios utilizando o acesso ventral [18] e lateral [29] ao MILN em cães, sem a marcação linfática. Tais estudos [18, 29] relatam uma área superficial afetada de 5% (variação, 5-30%), sendo as regiões periféricas as mais afetadas [18], o que também foi observado em nosso estudo. Vale lembrar que a dissecação roma do MILN foi empregada em todos os animais, sendo a energia bipolar brevemente aplicada para hemostasia em apenas um animal. Em outro estudo, a energia bipolar foi utilizada constantemente para dissecação [18, 29]. A hemostasia por dissecação roma pode ter sido associada à maior necessidade do pinçamento da cápsula do MILN, podendo explicar a maior concentração periférica de artefatos e maior porcentagem de área afetada por artefatos. Porém, uma vez que o parênquima do linfonodo é a principal região a ser avaliada na pesquisa por metástases, a região periférica possui menor importância clínica para avaliação histopatológica.

A marcação do MILN pode auxiliar na sua identificação durante a dissecação do tecido perinodal, como observado pela literatura [11, 15] pois, além de localizar-se em uma região nobre, o MILN pode ainda estar intimamente ligado à artéria ilíaca circunflexa profunda (Fig. 1F).

Uma das vantagens do posicionamento dos portais na linha média ventral, em relação ao posicionamento paramediano, é o menor risco de formação de seroma pós-operatório pela menor dissecação de tecido mole, conforme descrito pela literatura [1, 3]. Outra vantagem diante do posicionamento paramediano e da técnica com dois portais [6, 7] é a reduzida área de tricotomia exigida, expondo menor superfície de pele do paciente no campo operatório tornando a técnica mais estética.

A velocidade, concentração e volume de azul de metileno aplicado intradérmico ou intranodal é bastante variável na literatura [10, 25, 26, 27, 28]. Em nosso estudo, utilizamos uma dose fixa (0,5 mg/kg) de azul de metileno 1% diluído na proporção de 1:4 em NaCl 0.9%, dessa maneira, o volume de corante aplicado foi proporcional ao peso de cada animal, o que resulta em um volume de 0.2 ml/kg nos animais que receberam a dose total. Porém no grupo T, em três animais o MILN pôde ser identificado com a metade do volume total estipulado, o que equivale a dose de 0,25 mg/kg do azul de metileno na diluição descrita. A coloração destes MILNs foi classificada por todos os avaliadores como grau 2 em dois animais e grau 1 em um animal.

Segundo estudo prévio com aplicação de iohexol no linfonodo poplíteo de 15 cães, o volume de 0.1 e 0.2 ml/kg de contraste iodado é capaz de marcar os vasos linfáticos lombares em 87.6 (\pm 18.4) e 59.4 (\pm 10.8) seg, respectivamente [9]. Tal estudo também verifica que, diferentemente dos grupos submetidos as doses inferiores (30 e 60 mgI/kg), todos os animais submetidos a aplicação de 90 mgI/kg (0.3 ml/kg) tiveram extravasamento extranodal [9]. Apesar da literatura contraindicar a aplicação de um volume intranodal maior que 1 ml, devido à possibilidade de extravasamento substancial de corante [10], o volume mínimo de corante aplicado no grupo P foi de 1.52 ml.

Mayer et al. [20], pela injeção percutânea guiada por ultrassom aplicaram uma média de 7.4 ml (variação, 2.8-10ml) de Iohexol no linfonodo poplíteo de 42 cães, havendo extravasamento em somente 24 deles. Nesse estudo, tomou-se o cuidado de não aplicar rapidamente o corante, afim de não sobrecarregar a capacidade de volume do linfonodo poplíteo através da injeção lenta e pulsátil do corante, como indicado previamente [28]. Juntamente ao acompanhamento ultrassonográfico, o ingurgitamento discreto do linfonodo podia ser notado durante a injeção do corante, como percebido por Steffey & Mayhew [28], bem como o aumento da sua ecogenicidade (Fig. 2G, Fig. 2H e Fig. 2I) , o que é relatado em

cães [21] e gatos [17]. Mesmo assim, em alguns animais do grupo P, durante a injeção do corante uma quantia sutil de líquido anecóico ao redor do linfonodo pode ser vista. Isso é indício de extravasamento extranodal de corante [17, 21].

Para o controle exato da velocidade de injeção do volume de iohexol no linfonodo poplíteo de 12 cães saudáveis, foi utilizado uma bomba de infusão de seringa, com uma taxa de aplicação de 1.67 ml/min [21]. Mesmo assim, os autores do referido artigo observaram extravasamento extranodal em todos os animais. Contudo estudo prévio com o mesmo corante relatou não haver extravasamento extranodal significativo, utilizando uma taxa de aplicação de 2 ml/min no linfonodo poplíteo de quatro cães saudáveis [22]. Em nosso estudo prévio em cadáveres, tornou-se demasiadamente demorada a injeção com a bomba de infusão, devido a mesma acusar constantemente obstrução do sistema. De fato, a influência da velocidade de aplicação no extravasamento extranodal de corante durante a injeção intranodal exige futuros estudos.

Para a aplicação percutânea intranodal de corante do grupo P, nos baseamos em estudos prévios que o fizeram utilizando iohexol em cães [21] e gatos [17]. A adaptação de um extensor entre o cateter e a seringa permite ao ultrassonografista realizar a punção do linfonodo ao mesmo tempo em que posiciona o transdutor ultrassonográfico. Após treinamento prévio em cadáveres, tal modificação pareceu também evitar que o aplicador involuntariamente deslocasse o cateter de sua posição durante a aplicação do corante, assim como permitiu fornecer melhor apoio para o posicionamento intranodal do cateter. No intuito de evitar a contaminação do campo operatório, a tração do membro cranialmente como descrito pela literatura [17, 21], não pôde ser realizada durante a marcação no grupo P, uma vez que foi realizada simultaneamente á abordagem laparoscópica. Tal tração do membro cranialmente visa distender o tecido mole ao redor do linfonodo poplíteo, o que minimiza o movimento do linfonodo durante a punção com a agulha.

Danos ao linfonodo poplíteo durante a abordagem cirúrgica podem ocorrer [10, 28], o que pode prejudicar o fluxo linfático [10]. Quando utilizada a técnica aberta de abordagem do poplíteo, é contraindicado a dissecação da gordura perinodal cranialateral, afim de evitar a ruptura de vasos linfáticos aferentes e eferentes [28]. A técnica guiada por ultrassonografia evita tais danos, porém exige equipamento de boa qualidade e preferencialmente probe específica para identificação do linfonodo, o qual pode ser confundido com a musculatura adjacente.

Em humanos com melanoma na pele das costas, a literatura descreve um padrão de drenagem, segundo eles inesperado, atravessando a parede corporal e chegando aos linfonodos sentinelas de áreas retroperitoneais para aórticas e paralombares [31]. Tal padrão de drenagem foi também observado por Suami et al. [30] em cães. O estudo comprovou a drenagem linfática diretamente da pele da região glútea dorsal para o MILN, sendo ele o linfonodo sentinela dessa região e o único pelo qual normalmente a linfa passa para chegar à circulação venosa. Em nosso estudo, tal via aferente ao MILN mostrou-se viável na marcação deste linfonodo, não havendo diferença significativa entre as vias testadas quanto ao tempo de identificação do MILN marcado e grau de coloração intra e pós-operatório ($p \geq .592$).

Apesar da diluição do corante, a hipersensibilidade cutânea no local de aplicação ocorreu em 3/12 cadelas, condição relatada em estudo prévio após aplicação intradérmica de azul de metileno 1% em cadelas híginas [26]. Contudo, nesse último estudo foi utilizado volume de 0.5 a 1 ml de azul de metileno 1% para cães de até 15 kg e acima de 15 kg, respectivamente, havendo reação de hipersensibilidade em todos os animais. Assim, atribuímos a menor taxa de reação à diluição utilizada em nosso estudo.

Mesmo com a desvantagem da reação cutânea ao corante, a aplicação intradérmica é uma alternativa menos invasiva, mais fácil e acessível, frente o acesso cirúrgico e à aplicação intranodal guiada por ultrassom, respectivamente. Além disso, como já descrito anteriormente

[22], a comparação histopatológica entre o linfonodo submetido a aplicação e o contra lateral seria necessária para avaliar a injúria tecidual causada pela aplicação intranodal do corante.

Apesar de restringirmos o peso e o ECC na escolha dos animais experimentais, a deposição de tecido adiposo retroperitoneal teve uma variação perceptível entre os indivíduos. Portanto, o momento exato da marcação do MILN não pôde ser avaliado nos animais que exigiram a dissecação do tecido adiposo retroperitoneal (21/24), já que o MILN só pode ser observado após a dissecação. Dessa forma como relatado previamente [28], uma limitação no uso do azul de metileno é a avaliação da marcação de tecidos mais profundos. Tais autores utilizaram verde de indocianina como agente fluorescente em 15 cães, para identificar o ducto torácico através da marcação linfática por fluorescência com infravermelho. Segundo estudo prévio, a luz infravermelha pode proporcionar avaliações de até 10 mm de profundidade [14]. Tal técnica, apesar de mais onerosa frente ao uso de azul de metileno, poderia disponibilizar melhores resultados quanto ao tempo de marcação do MILN.

Pela ausência de estudos que avaliam a classificação da coloração do MILN pelo azul de metileno em cães, nosso estudo baseou-se em estudos prévios que avaliam a coloração do ducto torácico em cães pelo mesmo corante [10, 28]. Optamos por não aplicar o grau 3 (coloração azul intensa, maior do que a ideal) em nosso estudo, uma vez que a diferença entre a coloração ideal e maior do que a ideal, seria bastante subjetiva.

Quanto às limitações das avaliações de coloração do MILN, uma coloração maior pode ter sido atribuída durante a linfadenectomia, uma vez que toda sua superfície do linfonodo foi visualizada. O contrário pode também ter ocorrido pela menor presença de sangue sobre a superfície do MILN tingido na avaliação pós-operatória. Contudo, consideramos a avaliação intraoperatória mais relevante na aplicação clínica, uma vez que a marcação linfática será empregada durante o procedimento cirúrgico.

2.6.CONCLUSÃO

A linfadenectomia do MILN esquerdo é adequada via cirurgia laparoscópica com três portais na linha média ventral, mantendo a biópsia com qualidade aceitável para avaliação histopatológica em 95.8% dos casos.

A aplicação de corante em ambos os locais testados utilizando a metodologia descrita pode atingir 91.7% de sucesso na marcação do MILN esquerdo.

Não há diferença significativa no tempo de identificação do MILN marcado, bem como da qualidade de marcação com azul de metileno a 0,25% quando comparados os sítios de aplicação estudados.

2.7.AGRADECIMENTO

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

2.8.REFERÊNCIAS

1. Adamovich-Rippe, K. N., Mayhew, P. D., Runge, J. J., Culp, W. T. N., Steffey, M. A., Mayhew, K. N. e Hunt, G. B. 2013. Evaluation of laparoscopic-assisted ovariohysterectomy for treatment of canine pyometra. *Vet. Surg.* **42**: 572–578.
2. Anderson, C. L., MacKay, C. S., Roberts, G. D. e Fidel, J. 2015. Comparison of abdominal ultrasound and magnetic resonance imaging for detection of abdominal lymphadenopathy in dogs with metastatic apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. *Vet. Comp. Oncol.* **16**: 505–510.
3. Austin, B., Lanz, O. I., Hamilton, S. M., Broadstone, R. V. e Martin, R. A. 2003. Laparoscopic ovariohysterectomy in nine dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **39**: 391–396.
4. Baldwin, K., Bartges, J., Buffington, T., Freeman, L. M., Grabow, M. e Ostwald, D. 2010. AAHA nutritional assessment guidelines for dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **46**: 285-296.
5. Bezuidenhout, A. J. 2013. The lymphatic system. pp. 535-562. In: Miller's anatomy of the dog, 4^a ed. (Evans, H. E.; Lahunta, A. eds.), Elsevier, St. Louis (MO).
6. Brun, M. V. 2015. Cirurgia no aparelho reprodutor de caninos. pp. 186-214. In: Videocirurgia em pequenos animais. (Brun, M. V. ed.), Roca, Rio de Janeiro (RJ).
7. Buote, N. J. 2015. Laparoscopic ovariectomy and ovariohysterectomy. pp. 207-216. In: Small Animal laparoscopy and thoracoscopy, 1^a ed. (Fransson, B. A.; Mayhew, P. D. eds.), John Wiley & Sons, Hoboken.
8. Burgess, K. E. e DeRegis, C. J. 2019. Urologic oncology. *Vet. Clin. Small Anim.* **49**: 311-323.
9. Chun H., Cho, H., Cheon, H., Kim, J., Kim, T., Kang, J., Kim, G., Lee, Y., Choi, H., Lee, H. e Chang, D. 2009. Determination of optimal dosage and delay time for

- computed tomographic lymphography after percutaneous injection of iohexol into popliteal lymph nodes in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 873–878.
10. Enwiller, T. M., Radlinsk, M. G., Mason, D. E. e Roush, J. K. 2003. Popliteal and mesenteric lymph node injection with methylene blue for coloration of the thoracic duct in dogs. *Vet. Surg.* **32**: 359-364.
 11. Feranti, J. P. S., Coradini, G. P., Linhares, M. T., Hartmann, H. F., Campos, R. V., Oliveira, M. T., Chaves, R. O., Silva, A. J. C., e Brun, M. V. 2018. Iliac lymphadenectomy following Intrauterine mapping in a female dog with breast neoplasm. *Acta Scientiae Veterinariae* **46**: 273-277.
 12. Ferrari, R., Marconato, L., Buracco, P., Boracchi, P., Giudice, C., Iussich, S., Grieco, V., Chiti, L. E., Favretto, E. e Stefanello, D. 2018. The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: a multicentric retrospective study. *Vet. Comp. Oncol.* **16**: 505–510.
 13. Fournier, Q., Cazzini, P., Bavcar, S., Pecceu, E., Ballber, C. e Elders, R. 2018. Investigation of the utility of lymph node fine-needle aspiration cytology for the staging of malignant solid tumors in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* **47**:489–500.
 14. Gioux, S., Choi, H. S. e Frangioni, J. V. 2010. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol. Imaging* **9**: 237–255.
 15. Justino, R. C., Cardoso, G. S., Trautwein, L. G. C., Dessunti, G. T., Oliveira, D. V., Bernardes, R. e Martins, M. I. M. 2014. Uterine lymphangiography: comparison of two methods for locating the medial iliac lymph node *Pesq. Vet. Bras.* **34**: 1121-1126.
 16. Lam, T. K., Uren, R. F., Scolyer, R. A., Quinn, M. J., Shannon, K. F. e Thompson, J. F. 2009. False-negative sentinel node biopsy because of obstruction of lymphatics by metastatic melanoma: the value of ultrasound in conjunction with preoperative lymphoscintigraphy. *Melanoma Res.* **19**: 94–99.

17. Lee, N., Won, S., Choi, M., Kim, J., Yi, K., Chang, D., Choi, M. e Yoon, J. 2012. CT thoracic duct lymphography in cats by popliteal lymph node iohexol injection. *Vet. Radiol. Ultrasound* **53**: 174–180.
18. Lim, H., Kim, J., Li, L., Lee, A., Jeong, J., Ko, J., Lee, S., Kweon, O. e Kim, W. H. 2017. Bilateral medial iliac lymph node excision by a ventral laparoscopic approach: technique description. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1603–1610.
19. Llabrés-Díaz, F. J. 2004. Ultrasonography of the medial iliac lymph nodes in the dog. *Vet. Radiol. Ultrasound* **45**: 156–165.
20. Mayer, M. N., Sweet, K. A., Patsikas, M. N., Sukut, S. L. e Waldner, C. L. 2018. Frequency of an accessory popliteal efferent lymphatic pathway in dogs. *Vet. Radiol. Ultrasound* **59**: 365–373.
21. Millward, I. R., Kirberger, R. M. e Thompson, P. N. 2011. Comparative popliteal and mesenteric computed tomography lymphangiography of the canine thoracic duct. *Vet. Radiol. Ultrasound* **52**: 295–301.
22. Naganobu, K., Ohigashi, Y., Akiyoshi, T., Hagio, M., Miyamoto, T. e Yamaguchi, R. 2006. Lymphography of the thoracic duct by percutaneous injection of iohexol into the popliteal lymph node of dogs: experimental study and clinical application. *Vet. Surg.* **35**: 377–381.
23. Palladino, S., Keyerleber, M. A., King, R. G. e Burgess, K. E. 2016. Utility of computed tomography versus abdominal ultrasound examination to identify iliosacral lymphadenomegaly in dogs with apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. *J. Vet. Intern. Med.* **30**: 1858–1863.
24. Pollard, R. E.; Fuller, M. C.; Steffey, M. A. 2015 Ultrasound and computed tomography of the iliosacral lymphatic centre in dogs with anal sac gland carcinoma. *Vet. Comp. Oncol.* **15**: 299-306.

25. Sakals, S., Schmiedt, C. W. e Radlinsky, M. G. 2011. Comparison and description of transdiaphragmatic and abdominal minimally invasive cisterna chyli ablation in dogs. *Vet. Surg.* **40**: 795–801.
26. Souza, F. W., Brun, M. V., Feranti, J. P. S., Oliveira, M. T., Copat, B., Baumer, S., Kasper, P. N., Schmitt, B., Chaves, R. O e Brum, J. S. 2016. Laparoscopic inguinoiliac lymphadenectomy following staining using different lymphatic markers in healthy dogs. *Ciênc. Rural* **46**: 1629-1634.
27. Souza, F. W., Brun, M. V., Nardi, A. B., Huppes, R. R., Quarterone C., Raposo, T. T. M., Kasper, P. N., Oliveira, M. T. e Guedes, R. L. 2013. Laparoscopic lymphadenectomy in a bitch with breast câncer. *Ciênc. Rural* **43**: 750-753.
28. Steffey, M. A. e Mayhew, P. D. 2017. Use of direct near-infrared fluorescent lymphography for thoracoscopic thoracic duct identification in 15 dogs with chylothorax. *Vet. Surg.* **47**: 267-276.
29. Steffey, M. A., Daniel, L., Mayhew, P. D., Affolter, V. K., Soares, J. H. N. e Fuller, M. C. 2015. Laparoscopic extirpation of the medial iliac lymph nodes in normal dogs. *Vet. Surg.* **44**: 59-65.
30. Suami, H., O'Neill, J. K., Pan, W. R. e Taylor, G. I. 2008. Perforating lymph vessels in the canine torso: direct lymph pathway from skin to the deep lymphatics. *Plast. Reconstr. Surg.*
31. Uren, R. F., Howman-Giles, R. e Thompson, J. F. 2003. Patterns of lymphatic drainage from the skin in patients with melanoma. *J. Nucl. Med.* **44**: 570-582.
32. Van Goethem, B., Van Nimwegen, S. A., Akkerdaas, I., Murrell, J. C. e Kirpensteijn, J. 2012. The effect of neuromuscular blockade on canine laparoscopic ovariectomy: a double-blinded, prospective clinical trial. *Vet. Surg.* **41**: 374–380.

33. Van Goethem, B. E. B. J., Rosenveldt, K. W. e Kirpensteijn, J. 2003. Monopolar versus bipolar electrocoagulation in canine laparoscopic ovariectomy: a nonrandomized, prospective, clinical trial. *Vet. Surg.* **32**: 464-470.
34. Warland, J., Amores-Fuster, I., Newbury, W., Brearley, M. e Dobson, J. 2014. The utility of staging in canine mast cell tumours. *Vet. Comp. Oncol.* **12**: 287–298.
35. Worley, D. R. 2014. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Vet. Comp. Oncol.* **2**: 215–226.

2.9.LEGENDA DAS FIGURAS

Fig. 1. Imagens intraoperatórias do posicionamento dos portais laparoscópicos, marcação e linfadenectomia do MILN esquerdo. (A) Tricotomia e sítios de posicionamento dos portais. (B) Posicionamento dos portais. (C) Localização da região anatômica do MILN. (D) Início da marcação do MILN. (E) Início da dissecação do MILN. (F) Dissecação de um MILN intimamente envolto na artéria ilíaca circunflexa profunda.

Fig. 2. Imagens intraoperatórias, pós operatórias e ultrassonográficas durante a marcação MILN esquerdo. (A) Tricotomia da região glútea caudal esquerda. (B) Posicionamento dos campos cirúrgicos durante aplicação do corante (C) Aplicação intradérmica do corante. (D) Reação pós operatória de hipersensibilidade ao corante aplicado intradérmico. (E) Tração e extensão do membro pélvico esquerdo e posicionamento do aplicador durante aplicação do corante no linfonodo poplíteo (F) Posicionamento do ultrassonografista para localização do linfonodo poplíteo e posicionamento do cateter intranodal. (G) Imagem ultrassonográfica da localização do linfonodo poplíteo. (H) Imagem ultrassonográfica do posicionamento do cateter intranodal. (I) Imagem ultrassonográfica do linfonodo poplíteo após aplicação do corante.

2.10.LEGENDA DAS TABELAS

Tabela 1. Sumarização dos dados das cadelas submetidas a aplicação do corante intradérmico no torso.

Tabela 2. Sumarização dos dados das cadelas submetidas a aplicação do corante intraparenquimatoso no linfonodo poplíteo.

Tabela 3. Sumarização dos dados dos MILNs coletados das cadelas submetidas a aplicação do corante intradérmico no torso.

Tabela 4. Sumarização dos dados dos MILNs coletados das cadelas submetidas a aplicação do corante intraparenquimatoso no linfonodo poplíteo.

Tabela 1. Sumarização dos dados das cadelas submetidas a aplicação do corante intradérmico no torso.

| Cão | Peso (kg) | ECC (1-9) | Tempo de Identificação do MILN Marcado (seg) | Tempo de Dissecação do MILN (min) | Grau de Coloração Intraop. (0-3) | Grau de Coloração Pós-op. (0-3) |
|-----|-----------|-----------|--|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 13.9 | 4 | 257 | 16.8 | 1 | 1 |
| 2 | 12.3 | 6 | 118 | 6.1 | 2 | 2 |
| 3 | 16.7 | 4 | 111 | 8.4 | 2 | 2 |
| 4 | 13.3 | 5 | 422 | 4.6 | 1 | 1 |
| 5 | 17.2 | 4 | 317 | 6.2 | 2 | 2 |
| 6 | 15.5 | 4 | 76 | 9.8 | 2 | 1 |
| 7 | 15 | 4 | 220 | 6.4 | 1 | 2 |
| 8 | 12.5 | 5 | - | 6.6 | 0 | 0 |
| 9 | 14.7 | 4 | 343 | 8.8 | 2 | 2 |
| 10 | 15.7 | 4 | 46 | 8.7 | 2 | 2 |
| 11 | 10.9 | 5 | 366 | 9.2 | 1 | 1 |
| 12 | 16 | 5 | 333 | 11.4 | 2 | 1 |

*ECC = Escore de Condição Corporal.

Tabela 2. Sumarização dos dados das cadelas submetidas a aplicação do corante intraparenquimatoso no linfonodo poplíteo.

| Cão | Peso (kg) | ECC (1-9) | Tempo de Identificação do MILN Marcado (seg) | Tempo de Dissecação do MILN (min) | Grau de Coloração Intraop. (0-3) | Grau de Coloração Pós-op. (0-3) |
|-----|-----------|-----------|--|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 9.7 | 6 | 356 | 5.8 | 1 | 2 |
| 2 | 11.7 | 4 | 82 | 8.3 | 2 | 2 |
| 3 | 10.8 | 5 | - | 5.3 | 0 | 1 |
| 4 | 7.6 | 5 | 222 | 7.2 | 2 | 2 |
| 5 | 14.9 | 4 | 65 | 10.9 | 2 | 2 |
| 6 | 8.6 | 4 | 252 | 7.8 | 2 | 2 |
| 7 | 9.8 | 4 | 720 | 5 | 1 | 0 |
| 8 | 11.3 | 6 | 101 | 12 | 2 | 2 |
| 9 | 11.7 | 5 | 252 | 10.1 | 2 | 2 |
| 10 | 11.6 | 5 | 187 | 7 | 2 | 2 |
| 11 | 13.8 | 5 | 129 | 6.2 | 2 | 2 |
| 12 | 10.6 | 5 | 254 | 5.6 | 2 | 2 |

*ECC = Escore de Condição Corporal

Tabela 3. Sumarização dos dados dos MILNs coletados das cadelas submetidas a aplicação do corante intradérmico no torso.

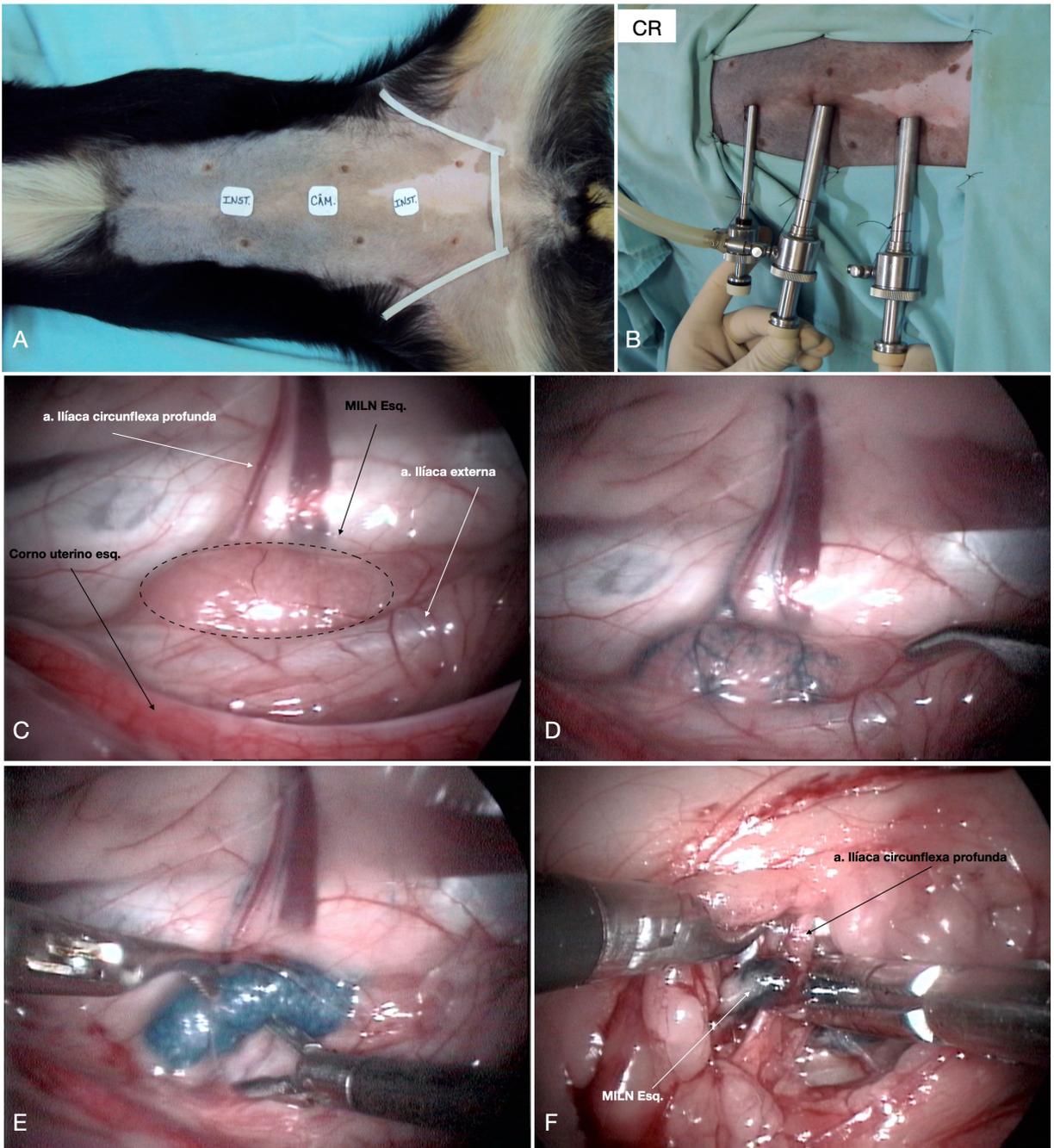
| Amostra | C x L x A (mm) | Artefatos da Região Central (0-4) | Artefatos da Região Periférica (0-4) | Área total da superfície (%) do MILN avaliado afetado por artefatos |
|--------------------|-------------------|---|--|---|
| 1 | 11 x 4 x 4 | 0 | 2 | 10% |
| 1.1 ^{a)} | 4 x 3 x 2 | 0 | 2 | 10% |
| 2 | 18 x 8 x 6 | 1 | 2 | 10% |
| 3 | 22 x 10 x 8 | 0 | 2 | <5% |
| 4 | 18 x 10 x 7 | 2 | 2 | 10% |
| 5 | 19 x 10 x 4 | 0 | 2 | 5% |
| 6 | 27 x 10 x 6 | 0 | 3 | 10% |
| 7 | 8 x 5 x 3 | * | 3 | 30% |
| 8 | 18 x 13 x 5 | 1 | 2 | <5% |
| 9 | 10 x 8 x 5 | 1 | 3 | 10% |
| 10 | 20 x 13 x 8 | 1 | 2 | <5% |
| 11 | 33 x 11 x 8 | 0 | 2 | 5% |
| 12 | 23 x 10 x 5 | 1 | 3 | 15% |
| 12.1 ^{a)} | 13 x 5 x 5 | 1 | 3 | 15% |

C=Comprimento, L=Largura, A=Altura, a) Um MILN adicional identificado, *região medular não avaliada.

Tabela 4. Sumarização dos dados dos MILNs coletados das cadelas submetidas a aplicação do corante intraparenquimatoso no linfonodo poplíteo.

| Amostra | C x L x A (mm) | Artefatos da Região Central (0-4) | Artefatos da Região Periférica (0-4) | Área total da superfície (%) do MILN avaliado afetado por artefatos |
|---------|-------------------|---|--|---|
| 1 | 10 x 5 x 3 | 0 | 3 | 20% |
| 2 | 22 x 12 x 6 | 0 | 3 | 20% |
| 3 | 12 x 8 x 5 | 0 | 3 | 15% |
| 4 | 17 x 7 x 4 | 0 | 3 | 20% |
| 5 | 28 x 12 x 7 | 2 | 3 | 20% |
| 6 | 8 x 5 x 3 | 0 | 2 | 10% |
| 7 | 20 x 6 x 4 | 2 | 3 | 30% |
| 8 | 18 x 10 x 6 | 2 | 3 | 20% |
| 9 | 22 x 8 x 5 | 2 | 3 | 20% |
| 10 | 20 x 10 x 5 | 1 | 2 | 5% |
| 11 | 18 x 13 x 3 | 2 | 2 | 10% |
| 12 | 15 x 10 x 5 | 0 | 3 | 5% |

C=Comprimento, L=Largura, A=Altura.





3. CONCLUSÃO

Estudos quanto aos locais de marcação e o desenvolvimento de técnicas de linfadenectomia do MILN, tal como realizado no presente estudo, são muito importantes para aplicação clínica em pacientes oncológicos que possam ter o envolvimento desse linfonodo na evolução da doença.

O presente estudo é o primeiro a descrever o emprego do acesso laparoscópico com três portais na linha média para linfadenectomia do MILN esquerdo em cães, tendo potencial de aplicação na linfadenectomia do MILN direito. Igualmente, a comparação realizada nesse estudo entre as vias de marcação linfática do MILN não havia sido descrita.

Com base nos resultados obtidos e analisados nesse estudo pode-se concluir que, em cadelas saudáveis, a técnica de acesso laparoscópico ventral com três portais na linha média é adequada para a linfadenectomia do MILN esquerdo, bem como mantém qualidade aceitável da amostra para avaliação histopatológica em 95.8% dos casos.

Com a avaliação laparoscópica, tanto a injeção de azul de metileno intradérmica na região glútea dorsal como no linfonodo poplíteo proporcionam adequada marcação do MILN esquerdo, não havendo entre as vias de aplicação diferença significativa quanto ao tempo de identificação do MILN marcado e intensidade de impregnação do MILN pelo corante .

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, C. L. et al. Comparison of abdominal ultrasound and magnetic resonance imaging for detection of abdominal lymphadenopathy in dogs with metastatic apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 16, n. 2, p. 505–510, 2015.
- BEZUIDENHOUT, A. J. The lymphatic system. In: EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. **Miller's Anatomy of the Dog**. 4^a ed. St. Louis, Missouri: Saunders, 2013. Cap. 13, p. 535-562.
- BURGESS, K. E.; DEREGIS, C. J. Urologic oncology. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 49, n. 2, p. 311-323, 2019.
- CABRAL, L. A.; VOLKWEIS, F. S. Terapêutica clínico-cirúrgica de neoplasias mamárias em cadelas. **Revista Científica do Curso de Medicina Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 16-30, 2017.
- CANADAS, A. et al. Canine Mammary Tumors: Comparison of Classification and Grading Methods in a Survival Study. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 2, p. 208-219, 2019.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of feline mammary tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 2, p. 1-17, e135084, 2018
- CHUN, H. et al. Determination of optimal dosage and delay time for computed tomographic lymphography after percutaneous injection of iohexol into popliteal lymph nodes in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 7, p. 873-878, 2009.
- COX, C. E. et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in patients with breast cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 51, n. 1, p. 525–542, 2000.
- 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**, v. 9, n. 2, p. 1-8, 2009.
- ENWILLER, T. M. et al. Popliteal and mesenteric lymph node injection with methylene blue for coloration of the thoracic duct in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 32, n. 4, p. 359-364, 2003.
- FERANTI, J. P. S et al. Iliac lymphadenectomy following Intrauterine mapping in a female dog with breast neoplasm. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, p. 273-277, 2018.
- GIOUX, S.; CHOI, H. S.; FRANGIONI, J. V. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. **Molecular Imaging**, v. 9, n. 5, p. 237–255, 2010.
- HENDERSON, R. A.; HARDIE, R. J.; PETRUS, D. J. Hemolymphatic system (lymphatics and lymph nodes). In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3^a ed. Philadelphia: Saunders, 2003. Cap. 71, p. 1063–1078.

JUSTINO, R. C. et al. Uterine lymphangiography: comparison of two methods for locating the medial iliac lymph node. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 11, p. 1121-1126, 2014.

LAM, T. K. et al. False-negative sentinel node biopsy because of obstruction of lymphatics by metastatic melanoma: the value of ultrasound in conjunction with preoperative lymphoscintigraphy. **Melanoma Research**, v. 19, n. 2, p. 94-99, 2009.

LIMA SÁNCHEZ, J. L. et al. Sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma: A 6 years study. **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 46, n. 1, p. 92-97, 2013.

LIM, H. et al. Bilateral medial iliac lymph node excision by a ventral laparoscopic approach: technique description. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 9, p. 1603-1610, 2017.

LLABRÉS-DÍAZ, F. J. Ultrasonography of the medial iliac lymph nodes in the dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 45, n. 2, p. 156-165, 2004.

LUND, A. W.; SWARTZ, M. A. Role of Lymphatic Vessels in Tumor Immunity: Passive Conduits or Active Participants?. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 341-352, 2010.

MAJESKI, S. A. et al. Indirect computed tomographic lymphography for iliosacral lymphatic mapping in a cohort of dogs with anal sac gland adenocarcinoma: technique description. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 0, n. 0, p. 1-9, 2017.

MEYER, M. N. et al. Frequency of an accessory popliteal efferent lymphatic pathway in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 59, n. 3, p. 365-373, 2018.

NAGANOBU, K. et al. Lymphography of the thoracic duct by percutaneous injection of iohexol into the popliteal lymph node of dogs: experimental study and clinical application. **Veterinary Surgery**, v. 35, n. 4, p. 377-381, 2006.

PALLADINO, S. Utility of computed tomography versus abdominal ultrasound examination to identify iliosacral lymphadenomegaly in dogs with apocrine gland adenocarcinoma of the anal sac. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1858-1863, 2016.

PATSIKAS, M. N. et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 35, n. 4, p. 228-234, 2006.

PEREIRA, C. T. et al. Lymphatic Drainage on Healthy and Neoplastic Mammary Glands in Female Dogs: Can it Really be Altered?. **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 32, n. 5, p. 282-290, 2003.

POLLARD, R. E ; FULLER, M. C.; STEFFEY, M. A. Ultrasound and computed tomography of the iliosacral lymphatic centre in dogs with anal sac gland carcinoma **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, n. 2, p. 299-306, 2015.

POTANAS, C. P.; PADGETT, S.; GAMBLIN, R. M. Surgical excision of anal sac apocrine gland adenocarcinomas with and without adjunctive chemotherapy in dogs: 42 cases (2005-

2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 8, p. 877-884, 2015.

SCHOPPMANN, S. F.; HORVAT, R.; BIRNER, P. Lymphatic vessels and lymphangiogenesis in female cancer : Mechanisms , clinical impact and possible implications for antilymphangiogenic therapies (Review). **Oncology Reports**, v. 9, n. 3, p. 455–460, 2002.

SKOBE, M. et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. **Nature Medicine**, v. 7, n. 2, p. 192–198, 2001.

SOUZA, F. W. et al. Laparoscopic inguinoiliac lymphadenectomy following staining using different lymphatic markers in healthy dogs. **Ciência Rural**, v. 46, n. 9, p. 1629-1634, 2016.

SPIGUEL, L. et al. Fluorescein isothiocyanate: a novel application for lymphatic surgery. **Annals of Plastic Surgery**, v. 78, n. 5, p. S296-S298, 2017.

STACKER, S. A. et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. **Nature**, v. 7, n. 2, p. 186–191, 2001.

STEFFEY, M. A.; MAYHEW, P. D. Use of direct near-infrared fluorescent lymphography for thoracoscopic thoracic duct identification in 15 dogs with chylothorax. **Veterinary Surgery**, v. 47, n. 2, p. 1–10, 2017.

STEFFEY, M. A. et al. Laparoscopic extirpation of the medial iliac lymph nodes in normal dogs. **Veterinary Surgery**, v. 44, p. 59-65, 2015.

SUAMI, H. et al. Perforating lymph vessels in the canine torso: direct lymph pathway from skin to the deep lymphatics. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 121, n. 1, p. 31-36, 2008.

UREN, R. F.; HOWMAN-GILES, R.; THOMPSON, J. F. Patterns of lymphatic drainage from the skin in patients with melanoma. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 4, p. 570-582, 2003.

WARLAND, J. et al. The utility of staging in canine mast cell tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 12, n. 4, p. 287–298, 2014.

WORLEY, D. R. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 12, n. 3, p. 215-226, 2014.

ANEXOS

Anexo A – Ficha de avaliação histopatológica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA



AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO MILN

Ficha de avaliação adaptada e baseada de Lim et al. (2017) e Steffey et al. (2015)

| |
|------------------------|
| Nº do animal: |
| Data de entrega: / / |
| Data do resultado: / / |
| Patologista: |
| Dimensões da amostra: |
| OBS: |

Artefatos histológicos

- Centrais (artefatos de pinça / pressão / esmagamento que afetam áreas centrais maiores do linfonodo);

- Periféricos (artefatos de pinça / pressão / esmagamento que afetam tecido perinodal, cápsula e córtex / paracórtex superficial do linfonodo);

| Escores | Ausente (0) | Mínimo (1) | Leve (2) | Moderado (3) | Severo (4) |
|------------------------------|----------------|---------------|-------------|-----------------|---------------|
| Localização Central | | | | | |
| Localização Periférica | | | | | |
| Superfície avaliada /afetada | | | | | |