

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

**LINFADENECTOMIA INGUINOILÍACA VIDEOLAPAROSCÓPICA EM CADELAS  
APÓS IMPREGNAÇÃO COM DIFERENTES MARCADORES LINFÁTICOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Fernando Wiecheteck de Souza**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**LINFADENECTOMIA INGUINOILÍACA VIDEOLAPAROSCÓPICA EM CADELAS  
APÓS IMPREGNAÇÃO COM DIFERENTES MARCADORES LINFÁTICOS**

**por**

**Fernando Wiecheteck de Souza**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Veloso Brun**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**LINFADENECTOMIA INGUINOILÍACA VIDEOLAPAROSCÓPICA EM CADELAS  
APÓS IMPREGNAÇÃO COM DIFERENTES MARCADORES LINFÁTICOS**

elaborada por  
**Fernando Wiecheteck de Souza**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO AVALIADORA:**

---

**Maurício Veloso Brun, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Peterson Triches Dornbusch (UFPR)**

---

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

---

**André Vasconcelos Soares, Dr. (UFSM)**

---

**Ney Luis Pippi, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 02 de junho de 2014

**“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”**

Chico Xavier

## AGRADECIMENTO

Em toda minha trajetória acadêmica, muitas foram as pessoas responsáveis em me auxiliar e orientar e a estas eu devo muito mais do que estes sinceros agradecimentos.

Agradeço inicialmente a Deus, figura de fé e inteligência suprema, e aos espíritos que me orientam e me confortam nos momentos mais difíceis.

A minha família, principalmente meu pai, José Fernando e Mabel e meu irmão Felipe, grandes exemplos de caráter e honestidade que sempre não negaram esforços para me auxiliar quando fosse necessário; Aos meus avós, Nair, Nadazir e Arnaldo, por acreditarem no caminho trilhado, nunca negando apoio nos momentos mais difíceis. Aos tios, tias e primos que estiveram presentes o tempo todo durante esse longo período dando força e incentivo para continuar;

A minha esposa Priscila, grande amor da minha vida, por todo companheirismo, amizade e cumplicidade e também por ter me escolhido pra seguir seu caminho juntos para a vida inteira. Você foi um grande presente de Deus na minha vida.

Ao meu orientador, grande mestre e pesquisador, a quem tenho uma admiração enorme, Prof. Dr. Maurício Veloso Brun, por todo apoio e conhecimento transmitido. Em todos esses anos, tornou-se um grande amigo e uma pessoa indispensável nessa fase de complementação da minha formação e um exemplo de profissional a ser seguido.

A todos os outros professores, que desde o período de graduação contribuíram na minha formação cirúrgica, Profa. Suely Rodasky, que me fez despertar o interesse em me dedicar ao estudo da cirurgia, aos professores Olicies da Cunha e Geane Maciel Pagliosa, por aprimorarem a minha técnica cirúrgica, dando-me a oportunidade de iniciar a carreira prática na cirurgia. Ao Dr. Rubem Bittencourt Cardoso Junior, ortopedista e cirurgião de excelência com quem aprendi muito e se tornou um grande amigo. Aos professores, Andriago Barboza de Nardi e Carlos Afonso de Castro Beck, também grandes amigos, por participarem ativamente nas fases cruciais da minha formação profissional. Ao grande professor e amigo Peterson Triches Dornbush, brilhante cirurgião e com um dom exemplar para o ensino da cirurgia. Ao professor André Soares Vasconcelos pela amizade e por sempre estar disposto em ajudar nos experimentos envolvendo a videolaparoscopia. Por fim, o meu agradecimento especial pela oportunidade de conviver e aprender com os dois professores que deixaram seus nomes marcados na história da cirurgia

veterinária, e contribuíram muito nesses últimos anos de formação, Prof. Alceu Gaspar Raiser e Prof. Ney Luis Pippi.

Aos amigos que participaram ativamente durante o projeto, João Pedro Feranti, Bernardo Schimitt, Sabrina Baumer, Felipe Santos, Hellen Hartmann e Juliana Brum o meu muito obrigado.

Aos amigos da pós-graduação Arícia Sprada, Marília Oliveira, Sérgio Santalucia, Jorge Castro, Saulo Tadeu de Lemos Pinto, Fabíola Dalmolin, Cristiano Gomes, André Sturion, Verônica Castro, Ítallo Barros, Tiago Treichel, Jaime Aramburú, Erika Garcia, Laeticia Trindade, Gabriele Serafini, Rafael Chaves, Renato Libardoni, Graciane Aiello, Antônio Coutinho, Maurício da Cruz, Raquel Baumhardt, Luis Felipe, Pedro Marchan, Francieli Marconato, Paula Basso e tantos outros, pela amizade e o apoio dado durante este período.

À estagiária Bruna Copat que incansavelmente se dedicou a ajudar na triagem e avaliação clínica dos animais que participaram desse experimento. Tenho certeza que seu futuro será brilhante na medicina veterinária.

Aos amigos de sempre, Bruno Dias, Rogério Guedes, Thyago Vargas, Demetrius Ramos, Fernando Lara, Marcos Cons, Rafael Huppés, Marco Augusto Machado e tantos outros que de uma forma ou outra, sempre estão por perto ajudando no que der e vier.

Á todos os animais, por serem o objetivo principal de tudo até aqui, em especial os meus: Dercy e meu querido Ice (*in memorian*).

Aos animais desta pesquisa meu eterno respeito e gratidão.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	08
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
1.1 Neoplasmas mamários em cadelas .....	12
1.2 Sistema linfático de cadelas associado à tumorigênese.....	14
1.3 Ovário-histerectomia videolaparoscópica em cadelas .....	16
1.4 Linfadenectomia videolaparoscópica .....	17
<b>2 IDENTIFICAÇÃO DA SITUAÇÃO</b> .....	19
<b>3 ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO</b>	
3.1 Uso de marcadores linfáticos no estabelecimento da drenagem linfática.....	21
<b>4 ARTIGO PUBLICADO</b>	
4.1 Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária: relato de caso.....	29
<b>ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO</b>	
5.1 Linfadenectomia pélvica laparoscópica, após impregnação linfática com diferentes marcadores em cadelas hípidas.....	37
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	56
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	59

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Corantes utilizados para delimitação linfática transoperatória de neoplasmas em cadelas. Azul de metileno a 1% e verde de indocianina a 1%.....	16
<b>Figura 2.</b> “A”, aplicação do azul de metileno estéril ao redor do tumor localizado na glândula mamária abdominal caudal esquerda e em “B” após 15 minutos da injeção intradérmica. “C”, trans-operatório da linfadenectomia abdominal esquerda, seta preta indicando a região lateral da artéria ilíaca interna e em “D” a cadeia de linfonodos sendo coletada e alojada no saco de coleta. “E”, portais videolaparoscópicos posicionados em triangulação para realização da linfadenectomia abdominal esquerda e ovário-histerectomia. “F”, trans-operatório da mastectomia radical unilateral esquerda.....	36
<b>Figura 3.</b> Linfadenectomia videolaparoscópica e marcação linfática em cadelas. Em “A”, disposição dos três portais de videocirurgia para realização da técnica de linfadenectomia videolaparoscópica com o animal em decúbito dorsal. Em “B”, posicionamento dos trocartes para execução da técnica de	



**Cont.** ovário-histerectomia videolaparoscópica com o paciente em decúbito lateral esquerdo. Em “C” e “D”, regiões laterais esquerda e direita paralelas aos vasos ilíacos internos, propostas para realização da técnica de linfadenectomia inguinoilíaca laparoscópica. Em “E”, etapa realizada durante a ovário-histerectomia para elevação do ovário e exposição do complexo artério-venoso ovariano através de sutura transparietal. “F”, cauterização bipolar seguida de secção com a pinça “powerblade TM®”..... 53

**Figura 4.** Exame histopatológico do tecido adiposo perivascular coletado por videolaparoscopia no intuito de obter biopsia de microlinfonodos. Em “A”, células grandes e bem diferenciadas, com citoplasma abundante e intensamente vacuolizado (adipócitos). Em “B”, tecido adiposo amarelo-claro e brilhante, entremeado de pequenas áreas brancacentas, por vezes avermelhadas (interpretado como vasos sanguíneos). Em “C” e “D”, reações de hipersensibilidade intradérmica e necrose provocadas após a aplicação do corante verde de indocianina a 1%. e do azul de metileno a 1%, ambas em região periglandular mamária inguinal direita..... 54

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 02 de junho de 2014

WIECHETECK, Fernando Souza. **LINFADENECTOMIA INGUINOILÍACA VIDEOLAPAROSCÓPICA EM CADELAS APÓS IMPREGNAÇÃO COM DIFERENTES MARCADORES LINFÁTICOS**. 2014. Tese de Doutorado (Doctorate in Small Animal Surgery) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

A linfadenectomia pélvica videolaparoscópica vem sendo realizada de forma rotineira na medicina, utilizando-se marcadores linfáticos injetáveis para delimitação do tecido linfático e promoção de margens cirúrgicas livres de tecidos tumorais em ressecções. Tal prática possui ainda finalidade terapêutica e diagnóstica quando os linfonodos da cadeia pélvica encontram-se tumorais, propiciando melhor prognóstico aos pacientes com determinados tipos de câncer. A linfadenectomia auxilia também no diagnóstico de metástases regionais em órgãos alvo bem como no estabelecimento do tipo de terapia a ser adotada no pós-operatório imediato. Contudo, na medicina veterinária esse procedimento é pouco realizado, e praticamente não aplicado em associação com a videocirurgia. Este trabalho consiste em três documentos científicos, sendo os dois primeiros demonstrando a experiência dos autores com as técnicas de marcação e ressecção linfática associada à neoplasmas mamários em casos clínicos. O último documento envolve pesquisa com animais hígidos sem neoplasmas mamários. Os resultados permitiram a verificação da eficácia da técnica de marcação linfática para a cadeia de linfonodos pélvicos utilizando os corantes (azul de metileno e verde de indocianina) em cães, permitindo a observação de linfonodos nas duas regiões laterais aos vasos ilíacos profundos extirpados via linfadenectomia videolaparoscópica e a efetividade e segurança da técnica cirúrgica empregada. Conclui-se que ainda se faz necessário a realização de novos estudos visando delimitar a cadeia de linfonodos pélvicos de animais sadios e apresentando neoplasmas mamários, para que consiga-se resultados melhores em relação à técnica de marcação linfática das glândulas mamárias de cadelas.

**Palavras-chaves:** laparoscopia, metástase, drenagem linfática, linfonodo sentinela, cães.

## ABSTRACT

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil  
Date and place of defense: Santa Maria, June 02<sup>nd</sup>, 2014.

WIECHETECK, Fernando Souza. **VIDEOLAPAROSCOPIC INGUINOILIACLYMPHADENECTOMY IN BITCHES AFTER IMPREGNATION WITH DIFFERENT LYMPHATIC MARKERS.** 2014. Tese de Doutorado (Doctorate in Small Animal Surgery) – Federal University of Santa Maria, Santa Maria – RS.

Laparoscopic pelvic lymphadenectomy has been performed routinely in medicine, using injectable lymphatic markers for delineation of lymphatic tissue and promoting free surgical margins of resection in tumor tissues. This practice also has therapeutic and diagnostic purposes when the pelvic lymph nodes are tumor-chain, resulting in a better prognosis for patients with certain types of cancer. Lymphadenectomy also aids in the diagnosis of regional metastases in other organs as well as in establishing the type of therapy to be adopted in the immediate postoperative period. However, this procedure is seldom performed in veterinary medicine, and practically not applied in combination with laparoscopy. This work consists of three scientific papers, with the first two showing the authors' experience with the techniques of marking and lymphatic resection associated with breast neoplasms in clinical cases. The last document involves research with healthy animals without mammary neoplasms. The results allowed us to check the effectiveness of the technique of lymphatic markup for the chain of pelvic lymph nodes using the dyes (methylene blue and indocyanine green) in dogs, allowing the observation of lymph node regions on both sides to deep iliac vessels excised via laparoscopic lymphadenectomy and the effectiveness and safety of the surgical technique. We conclude that it is still necessary to conduct further studies aiming to delineate string pelvic lymph nodes of healthy animals and presenting breast neoplasms, to achieve the best results in relation to the technique of lymphatic marking the mammary glands of female dogs

**Keywords:** laparoscopy, metastasis, lymphatic drainage, sentinel node, dogs.

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 NEOPLASMAS MAMÁRIOS EM CADELAS

Os neoplasmas mamários em caninos constituem aproximadamente 52% de todos os tumores que afetam as fêmeas desta espécie, dos quais aproximadamente 50% são malignos, ocorrendo metástase em cerca de 50% destes casos (QUEIROGA & LOPES, 2002).

Nessa espécie as glândulas mamárias se estendem da região torácica a inguinal, e estão dispostas em duas fileiras que compreendem cinco glândulas cada. São numeradas de 1 a 5, deslocando-se do sentido cranial ao caudal. Também são denominadas como torácicas (craniais e caudais), abdominais (mediais e caudais) e inguinais (FERRI, 2003).

Nas torácicas, a irrigação sanguínea é fornecida por meio de ramos perfurantes da artéria torácica interna, por meio de ramos cutâneos das artérias intercostais e via ramos da artéria torácica lateral. Já as glândulas abdominais caudais e inguinais recebem sangue da artéria epigástrica superficial caudal e dos ramos perivulvares da artéria pudenda externa. Na drenagem linfática a linfa geralmente flui a partir dos três pares craniais de glândulas mamárias em direção aos linfonodos axilares e, a partir dos dois pares caudais, em direção aos linfonodos inguinais (PINHEIRO et al., 2003).

Os linfonodos axilares drenam as três glândulas craniais e os inguinais as duas glândulas caudais. No entanto, há comunicação entre as glândulas entre si como também pela linha média. A drenagem linfática dos tumores mamários caninos é complexa, tendo sido demonstrado que podem existir comunicações linfáticas entre as cadeias mamárias direita e esquerda e entre

glândulas adjacentes de uma mesma cadeia, em direção cranial e caudal (QUEIROGA E LOPES, 2002).

As glândulas inguinais são frequentemente as mais afetadas por neoplasmas em cadelas (FERRI, 2003). Isso pode ser explicado, provavelmente, em decorrência do maior volume de tecido mamário se encontrar nestes últimos pares. Tumores mamários podem ter apresentação única ou múltipla. Geralmente são facilmente palpáveis como nódulos ou massas discretas dentro da glândula mamária (O'KEFFE, 1997).

A grande maioria das neoplasias mamárias é detectada em animais velhos e de meia idade, não havendo uma predisposição racial. O tipo de terapia utilizada pode ser clínica e/ou cirúrgica, sendo que a segunda desempenha melhores resultados para a cura da doença. Nestes casos é indicado a mastectomia radical, devendo ser acompanhada da remoção dos linfonodos inguinais e axilares quando estes estiverem afetados (SLEECKX et al., 2011).

Os tumores mamários benignos em cadelas geralmente são classificados em tumores mistos, adenomas ou tumores mesenquimatosos. Já os malignos são em sua maioria os carcinomas. Também podem ocorrer sarcomas e carcinosarcomas (tumores mistos malignos), onde os sarcomas apresentam incidência mais alta de metástases. Há ainda os carcinomas inflamatórios, que além de crescerem rapidamente, causam edema e inflamação acentuados, e são frequentemente ulcerados. Na maioria dos casos, tais neoplasmas apresentarem prognóstico ruim (QUEIROGA E LOPES, 2002).

Os tumores malignos da glândula mamária podem gerar metástases para vários órgãos, sendo os linfonodos regionais e os pulmões os mais frequentemente afetados (FIDLER & BRODEY, 1967).

## 1.2 SISTEMA LINFÁTICO DE CADELAS ASSOCIADO À TUMORIGÊNESE

O sistema linfático desempenha papel importante no controle local do tumor e também no transporte de células tumorais, representando a via mais comum de metástases em neoplasias. A partir do crescimento de algumas neoplasias, período esse conhecido como tumorigênese, há o aparecimento de fatores linfangiogênicos que induzem a formação de novos vasos linfáticos e ampliam a rede de drenagem tumoral para os linfonodos alvos e regionais (PEREIRA et al., 2003).

Em cadelas, estudou-se o sistema vascular e linfático do tecido mamário de animais saudáveis e neoplásicos, demonstrando a neoformação vascular e linfática nesta espécie, utilizando-se para tanto a aplicação do azul patente e do tecnécio TC99 sob o parênquima mamário (PINHEIRO et al., 2003).

PATSIKAS et al. (2006) estudando a drenagem linfática das glândulas mamárias apresentando neoplasmas, verificaram que na maioria dos casos ocorre drenagem das glândulas mamárias para os linfonodos regionais. As glândulas torácicas craniais e caudais drenam principalmente para os linfonodos axilares ipsilaterais. A glândula abdominal cranial drena em direção ao linfonodo axilar, porém, drena também para o linfonodo inguinal superficial ipsilateral. Já as glândulas abdominais caudais e inguinais drenam para o linfonodo inguinal superficial ipsilateral. Contudo, esse padrão não se repetiu em todos os animais, em alguns houve a descrição de conexões linfáticas entre glândulas mamárias adjacentes neoplásicas e normais.

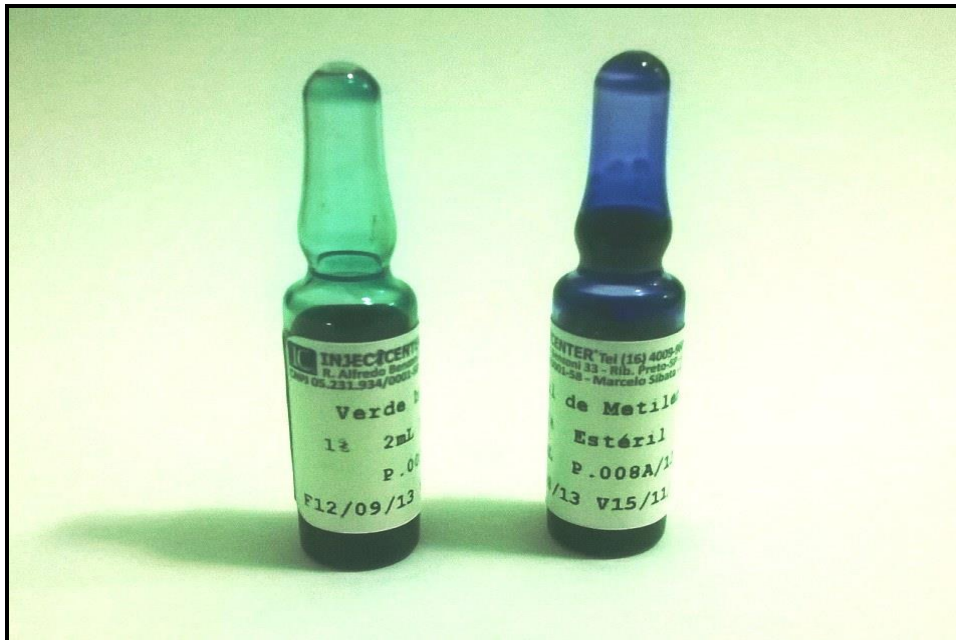
Recentemente foi realizado um consenso, entre vários médicos veterinários oncologistas na Universidade Federal de Minas Gerais, em que os critérios de diagnóstico e tratamento dos neoplasmas mamários foram discutidos. Ficou definido que ainda a remoção cirúrgica da cadeia de glândulas mamárias afetadas, juntamente com todo o tecido linfático associado deve ser

indicado, melhorando assim o prognóstico dos pacientes. Porém, frisou-se a importância do desenvolvimento de critérios de avaliação preditivos na tentativa de alcançar melhor planejamento cirúrgico com abordagens mais amplas e livres de células tumorais (CASSALI et al., 2011).

Outra questão a ser considerada tem a ver com tumores de menor diâmetro com probabilidade reduzida de comprometimento dos linfonodos regionais. Nesses casos, há o questionamento quanto à necessidade de linfadenectomia, que pode apresentar efeitos adversos como dor, parestesia, grau de impotência funcional, seroma e linfedema (COELHO-OLIVEIRA et al., 2004; QUADROS & GEBRIM, 2007).

Para que a linfadenectomia seja realizada somente nos casos em que há o comprometimento de linfonodos, pesquisas utilizando técnicas de mapeamento de linfonodo sentinela vêm sendo desenvolvidas. Tais técnicas são importantes visando verificar-se o aparecimento de metástases em tecidos celulares, e também para se delimitar os vasos linfáticos e linfonodos regionais, facilitando assim a retirada cirúrgica destas estruturas (PINHEIRO et al. 2003; SUGA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; MIYASHIRO et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

Dentre os marcadores linfáticos testados em cadelas, o azul de metileno estéril (Figura 1) é o mais comumente utilizado, outros, recentemente testados são o tecnécio (PINHEIRO et al., 2003), o iopamidol (SUGA et al., 2007), a hemossiderina (PINHEIRO et al., 2009) e, em humanos, o verde de indocianina (MIYASHIRO et al., 2010).



**Figura 1.** Corantes utilizados para delimitação linfática transoperatória de neoplasmas em cadelas. Azul de metileno a 1% e verde de indocianina a 1%.

### **1.3 OVÁRIO-HISTERECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA EM CADELAS**

A ovário-histerectomia (OVH) eletiva é a cirurgia mais amplamente realizada na medicina veterinária de pequenos animais (FOSSUM, 2005), sendo indicada no controle populacional, para o tratamento de endometrites supurativas, nos manejos de prolapso uterinos, nos tratamentos da hiperplasia endometrial cística e da hiperplasia vaginal, assim como tratamento auxiliar de algumas doenças sistêmicas como a diabetes e a epilepsia (FOSSUM, 2005).

Atualmente para os animais que já possuem neoplasma instalado em cadeia mamária, não se recomenda a realização da ovário-histerectomia, salvo os casos em que haja doença uterina ou



ovariana concomitante ou metástase intra-adominal. Em animais com neoplasma mamário desenvolvidos já não ocorre influencia hormonal proveniente do útero e dos ovários, a assim também se evita o risco de translocação de células tumorais para o interior da cavidade peritoneal durante o procedimento cirúrgico (CASSALI et al., 2011).

Tradicionalmente, a ovário-histerectomia é realizada por celiotomia via média ventral, sendo procedimento associado à boa recuperação, porém com dor pós-operatória considerada moderada (HANCOCK, 2005; MAYHEW & BROWN, 2007). De outra forma, os proprietários têm demonstrado maior interesse em na execução de cirurgias minimamente invasivas buscando reduzir a dor dos pacientes, procedimentos estes que estão associadas ao menor período de convalescença pós-operatória em humanos (MAYHEW & BROWN, 2007).

A cirurgia videolaparoscópica apresenta potenciais vantagens em relação à cirurgia convencional, tais como acesso através de pequenas incisões, menor lesão tecidual, menores desconforto e dor no pós-operatório, menor período de hospitalização do paciente, recuperação pós-cirúrgica mais rápida, menores custos globais e melhores resultados estéticos (MALM et al., 2004).

#### **1.4 LINFADENECTOMIA VIDEOLAPAROSCÓPICA**

As técnicas de linfadenectomia laparoscópica vêm sendo utilizadas com frequência, na medicina, para pacientes com neoplasias malignas, nos quais os tumores são grandes e envolvem o linfonodo alvo. Assim, a laparoscopia possui papel prognóstico, utilizando-se da biópsia para determinação da evolução da doença, e também terapêutico, quando é realizada a extirpação cirúrgica dos linfonodos e vasos linfáticos envolvidos (LAVERY et al., 2010).

O esvaziamento linfático inguinoilíaco em humanos é recomendado nos pacientes que apresentam neoplasias malignas de pênis, próstata e vesícula urinária. Já é conhecida a quantidade média de

linfonodos da cadeia pélvica, sendo esta dividida em regiões distintas para facilitar as técnicas de linfadenectomia laparoscópicas conforme o tipo de neoplasia em questão (DANGLE et al., 2010).

Atualmente se dispõe de técnica laparoscópica para linfadenectomia pélvica intra-abdominal, visando realizar um possível mapeamento linfático da cadeia mamária de animais com neoplasmas mamários, utilizando o corante azul de metileno a 1% (SOUZA et al., 2013).

## **2 IDENTIFICAÇÃO DA SITUAÇÃO**

Atualmente existem poucos estudos em relação à drenagem linfática das glândulas mamárias em cadelas. Também inexistem respostas quanto ao padrão de comunicação entre as cadeias linfáticas mamárias com as intrabdomiais (abdominais e pélvicas) em animais sadios ou com neoplasmas. O fato da cadeia de linfonodos pélvicos e abdominais se apresentar anatomicamente abaixo das glândulas mamárias gera questionamentos em relação à inter-relação de drenagem linfática entre os espaços intra e extracavitários.

Por esta razão, justifica-se a realização de estudos no sentido de conhecer em profundidade as características da drenagem linfática e estudar os diferentes tipos de corantes e tempos para sua devida marcação nos tecidos. Cabe ressaltar que inexistente atualmente a indicação de coleta desses linfonodos pélvicos em casos de neoplasma mamários, tampouco se essa proposta apresenta ou não importância clínica em animais com neoplasma. Caso a linfadenectomia abdominal e pélvica apresente importância no controle e prognóstico de neoplasmas em animais doentes, o benefício clínico desse procedimento será muito importante, já que a execução de protocolos quimioterápicos poderá ser iniciada precocemente nos casos indicados assim como tratamentos mais completos poderão ser executados.

A presente proposta científica buscou estudar diferentes técnicas de impregnação linfática, com potencial futuro de aplicação na obtenção de melhores e mais extensas margens cirúrgicas livres de células tumorais. Além disso, buscou-se também a verificação da eficácia da técnica de marcação linfática para a cadeia de linfonodos pélvicos utilizando dois diferentes corantes (azul de metileno e verde de indocianina) e o tempo necessário para cada corante conduzir tal situação. Verificar ainda quanto à adequação da técnica de linfadenectomia laparoscópica na obtenção de

amostras efetivas contendo linfonodos, e realizar a contagem, através do exame histopatológico, do número de linfonodos extirpados via linfadenectomia videolaparoscópica.

### **3. ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

Revista Ciência Rural. Santa Maria/RS.

QUALIS CAPES B1.

**Uso de marcadores linfáticos no estabelecimento da drenagem linfática**

**Use of lymphatic markers in the establishment of lymphatic drainage**

**- NOTA -**

#### **RESUMO**

A linfadenectomia, também denominada “esvaziamento linfático”, é realizada de forma rotineira na medicina humana, utilizando-se marcadores linfáticos injetáveis para delimitação do tecido linfático e promoção de margens cirúrgicas apropriadas durante a extirpação cirúrgica de neoplasmas. Na veterinária, ainda é realizada com uma frequência baixa e restringe-se a marcações linfáticas regionais para neoplasmas mamários. Este trabalho tem por objetivo demonstrar as técnicas de marcação linfática e o uso de novos marcadores, além de realizar um paralelo em relação à aplicação na área de oncologia veterinária.

**Palavras chaves:** linfadenectoma, esvaziamento linfático, oncologia, pequenos animais.

#### **ABSTRACT**

The lymphadenectomy, also called "draining lymph" is routinely performed in human medicine. For this it is used boundary markers to promote lymphatic tissues landmarks and surgical margins. In veterinary medicine, it is still held in low frequency and it is restricted to regional

lymph tags for breast neoplasms. This paper aims to demonstrate the techniques of lymphatic marking, the use of new lymphatic markers and conduct a parallel with the application in veterinary oncology.

**Key words:** lymphadenectomy, lymphatic draining, oncology, small animals.

## INTRODUÇÃO

A frequência elevada das afecções oncológicas em pequenos animais trouxe a necessidade do aprimoramento de técnicas de diagnóstico e tratamento dos diferentes tipos de neoplasmas (FONSECA & DALECK, 2000; SCHRENK et al., 2000). Dentre estas, o mapeamento linfático tumoral vem sendo muito estudado para o estabelecimento de uma abordagem cirúrgica mais apropriada (PEREIRA et al., 2003; PINHEIRO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

O estudo da drenagem linfática visando o planejamento terapêutico dos neoplasmas mamários iniciou na medicina com *Henry François Le Dran*, no século XVIII, que descreveu uma possível propagação da doença por via linfática. *William Stewart Halsted*, no século XIX, desenvolveu a técnica de mastectomia total, através da ressecção dos músculos peitorais e do esvaziamento linfático dos linfonodos axilares. Este foi o primeiro tratamento que permitiu a curabilidade desta neoplasia (MOULIN, 1983).

O sistema linfático, rede de capilares que possibilita a drenagem de partículas - entre elas as células neoplásicas - possui função imunológica, auxiliando no processo de resposta inflamatória e no controle de infecções. O líquido intersticial, presente nos capilares linfáticos, é drenado para o interior dos vasos linfáticos aferentes, que seguem até os linfonodos sentinelas (SCHRENK et al, 2000). O linfonodo sentinela é o primeiro local de drenagem do tumor. A

presença de células neoplásicas no linfonodo sentinela, segundo análise histopatológica, é indicativa de propagação tumoral, sendo um importante indício para a busca por outros focos de metástases (TUOHY et al., 2009).

O sistema linfático desempenha papel importante, para o controle local tumoral e também atua no mecanismo de transporte celular, sendo fator associado ao aparecimento de metástases em diversos tipos de neoplasmas (HAIGH & GIULIANO, 2000). Os locais mais comumente afetados por metástases são os linfonodos satélites, através da via linfática, e os pulmões, pela via hematogêna. Porém outras regiões afetadas por metástases incluem fígado, baço e pâncreas (PAPADOPOULOU et al., 2009; FILHO, 2010). A formação de novos vasos linfáticos, provocado por fatores linfangiogênicos, relaciona-se ao período de desenvolvimento da tumorigênese (HAIGH & GIULIANO, 2000).

Através do conhecimento do suprimento vascular e do mapeamento linfático peritumoral, a realização da extirpação cirúrgica dos neoplasmas torna-se mais adequada, já que permite a obtenção de margem cirúrgica mais ampla e menor quantidade de células neoplásicas remanescentes no sítio operatório, melhorando assim o prognóstico dos pacientes (PAPADOPOULOU et al., 2009; PINHEIRO et al., 2009).

Estudos vêm sendo realizados, através da impregnação de marcadores linfáticos biológicos e sintéticos, comparando a formação linfática de animais sem alterações neoplásicas e pacientes com neoplasmas já estabelecidos (PINHEIRO et al. 2003; SUGA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; MIYASHIRO et al., 2010).

Dentre os marcadores linfáticos testados em animais, o azul de metileno estéril é o mais comumente utilizado. Entre outras possibilidades testadas estão o tecnécio (PINHEIRO et al., 2003), o iopamidol (SUGA et al., 2007), a hemossiderina (PINHEIRO et al., 2009) e, em humanos, o verde de indocianina (MIYASHIRO et al., 2010). A importância do uso desses marcadores em pacientes com

neoplasmas visa verificar o aparecimento de metástases em tecidos celulares e delimitar os vasos linfáticos e linfonodos regionais durante os procedimentos cirúrgicos, facilitando assim as suas extirpações (LAVERY, 2010).

Estudando-se o sistema linfático mamário em cadelas saudáveis e com neoplasma, por meio do emprego de azul de metileno estéril (aplicado de forma intradérmico, sobre o parênquima mamário), foi demonstrado neoformação linfática. Tal diferença anatômica entre animais da mesma espécie pode estar relacionada a fatores linfangiogênicos tumorais. Também, utilizando-se o mesmo sistema em associação com uma substância radioativa (Tecnécio), foi possível a identificação do linfonodo sentinela o qual demonstra a drenagem inicial das neoplasias mamárias (PINHEIRO et al., 2003).

Os marcadores linfáticos são uma nova realidade na oncologia veterinária, com grande capacidade de desenvolvimento, porém é necessário o aprimoramento de técnicas de coloração e escolha do marcador com menor efeito adverso. A localização dos centros linfáticos, com auxílio dos marcadores, torna-se facilitada garantindo melhor eficiência na realização de cirurgias devido a remoção cirúrgica dos linfonodos afetados. A biópsia e posterior remoção dos linfonodos metastáticos positivos é de extrema importância para um melhor prognóstico aos pacientes.

Os autores do presente trabalho utilizam rotineiramente por cirurgia convencional dois dos corantes citados, o azul de metileno estéril a 1% e o verde de indocianina, para a delimitação de margens cirúrgicas linfonodais e linfadenectomia nos animais apresentando neoplasmas mamários. No conhecimento dos autores, o corante verde de indocianina ainda não havia sido utilizado com o propósito de promoção de delimitação linfática para extirpação de tecidos neoplásicos na medicina veterinária. Contudo, inicialmente se testou o seu uso, utilizando a mesma concentração usada para o azul de metileno estéril a 1%, em três cadelas portadoras de neoplasias mamárias, em glândulas inguinal e abdominal caudal esquerda. Nos três animais utilizou-se o mesmo volume que é usado para o azul de metileno a 1% (0,5mL – animais até



15kg / 1mL – animais acima de 15kg), aplicado de forma intradérmica, distribuindo o volume total de forma igual em quatro pontos equidistantes ao redor do maior tumor. Após a aplicação foi realizado massagem por cerca de um minuto ao redor dos locais de aplicação para possibilitar a drenagem do corante através dos vasos linfáticos. Nas três cadelas operadas conseguiu-se a delimitação linfática regional adjacente ao tumor e a eficácia da drenagem do corante para os linfonodos alvo, inguinal e axilar, que foram extirpados com segurança. Além disso, não foi observado durante o transoperatório, sinais de hipersensibilidade ao corante e todos os animais foram acompanhados no pós-operatório e não apresentaram alterações sugestivas de intoxicação ao uso do verde de indocianina a 1%.

Este relato reforça o uso de marcadores linfático em procedimentos cirúrgicos que envolvem neoplasmas mamários, sem danos aparentes ao animal, apesar de PINHEIRO et al. (2003) relatarem um casos de hipersensibilidade do tipo IV, com o uso do azul patente e o tecnécio tc99, o que não foi observado na experiência dos autores com o uso do verde de indocianina a 1% em pacientes apresentando neoplasmas mamários. A opção para substituição deste corante sintético seria o uso da hemossiderina, um corante autólogo com menor chance de causar reações de hipersensibilidade, conforme demonstrado no estudo de PINHEIRO et al. (2009).

Novos experimentos se fazem necessários visando a avaliação em relação ao tempo de aplicação dos corantes, possíveis adequações quanto à posologia de administração dos marcadores linfáticos, e extensão e necessidade das regiões de coleta de linfonodos regionais.

## REFERÊNCIAS

1. FILHO, J.C.O. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.2, p.177-185, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14390264.2009.00942.x/abstract;jsessionid=41683>>

4FDF1CC2F9FD8C46974B0B8F810.f03t04>. Acesso em: 04 abr. 2014. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000200014

2. FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.731-4, 2000. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v30n4/a30v30n4>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

3. HAIGH, P.I.; GIULIANO, A.E. Role of sentinel lymph node dissection in breast cancer. **Annals of Medicine**, v.32, p.51–56, 2000. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07853890008995910> >. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.3109/07853890008995910.

4. LAVERY, H.J. et al. Robotic extended pelvic lymphadenectomy for bladder cancer with increased nodal yield. **British Journal of Urology**, v.107, p.1802-5, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Robotic%20extended%20pelvic%20lymphadenectomy%20for%20bladder%20cancer%20with%20increased%20nodal%20yield>>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09789.x.

5. MIYASHIRO, I. et al. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. **Surgical Endoscopy**. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976497>>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1007/s00464-010-1405-3.

6. MOULIN, D. The short history of breast cancer. **Kluwer: Academic Publishers**; 1983.

7. PAPADOPOULOU, P. L. et al. The Lymph Drainage Pattern of the Mammary Glands in the Cat: A Lymphographic and Computerized Tomography Lymphographic Study. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.38, n.4, p.292-9, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14390264.2009.00942.x/abstract;jsessionid=41683>>

4FDF1CC2F9FD8C46974B0B8F810.f03t04>. Acesso em: 11 jan. 2014. DOI: 10.1111/j.1439-0264.2009.00942.x

8. 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. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x/abstract>>. Acesso em: 17 jan. 2014. DOI: 10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x

9. PINHEIRO, L.G.P. et al. Estudo Experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.545–552, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n6/a12v18n6.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2012 .

10. PINHEIRO, L.G.P. et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.24, p.432-436, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502009000600002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502009000600002)>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1590/S0102-86502009000600002.

11. SCHRENK, P. et al. Morbidity Following Sentinel Lymph Node Biopsy versus Axillary Lymph node Dissection for Patients with Breast Carcinoma. **Cancer**, v.88, p.608–614, 2000. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10970142\(20000201\)88:3%3C608::AID-CNCR17%3E3.0.CO;2-K/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10970142(20000201)88:3%3C608::AID-CNCR17%3E3.0.CO;2-K/full)>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 0.1002/(SICI)1097-0142(20000201)88.

12. SOUZA, F.W. et al. Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. **Ciência Rural**, v.43, p.750-3, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a11913cr2012-0376.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2014.

13. SUGA, K. et al. Cutaneous drainage lymphatic map with interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography using iopamidol: preliminary results. **Lymphology**, v.40, p.63-73, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853616>>. Acesso em: 30 mai. 2012.

14. TUOHY, J.L. et al. A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.7, n.2, p.81-91, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19453362>>. Acesso em: 05 jan. 2014. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00183.x

#### **4. TRABALHO PUBLICADO**

Ciência Rural, Santa Maria, v.40, n.4, p.750-753, abr, 2013.

**Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária: relato de caso.**

**Laparoscopic lymphadenectomy in a bitch with breast cancer: case report.**

**- NOTA –**

#### **RESUMO**

A linfadenectomia laparoscópica é realizada de forma rotineira na medicina, contudo é pouca utilizada na veterinária. Neste relato, um canino fêmea apresentando tumores na cadeia mamária esquerda (M4 e M5), foi submetido à aplicação intradérmica do azul de metileno estéril, ao redor do maior tumor (M5), buscando-se demarcação dos vasos linfáticos e linfonodos regionais. Após 15 minutos, iniciou-se a linfadenectomia abdominal videolaparoscópica na região inguinal esquerda, seguida da ovário-histerectomia (OVH) laparoscópica com três portais. Realizou-se ainda mastectomia total unilateral esquerda. Pela histologia, obteve-se dois linfonodos abdominais livres de células tumorais. A paciente não apresentou recidiva em 60 dias.

**Palavras-chave:** laparoscopia, metástase, drenagem linfática, linfonodo sentinela, cães.

#### **ABSTRACT**

The laparoscopic lymphadenectomy is routinely performed in medicine, but not in veterinary medicine. This report describes a case of female canine with tumors in the left mammary chain (M4 and M5), which was subjected to intra-dermal application of sterile methylene blue, around the largest tumor (M5)

for try to demarcate the lymphatic vessels and regional lymph nodes. After 15 minutes, laparoscopic lymphadenectomy involving the abdominal in the left pelvic region was start, followed to laparoscopic ovariohysterctomy (OVH) using three portals access. We performed too unilateral left total mastectomy. For histology, two gave negative abdominal lymph nodes tumor cells. The patient had no recurrence in 60 days.

**Key words:** laparoscopic, metastasis, lymphatic drainage, sentinel node, dogs.

## INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias em animais são tratadas cirurgicamente, devido à possibilidade de malignidade tumoral e de ocorrência de metástase subsequente para outros órgãos (SCHRENK et al., 2007). Nessas situações, o sistema linfático desempenha papel importante, tanto no controle local tumoral como no mecanismo de transporte celular, sendo fator associado ao aparecimento de metástases em diversos tipos de neoplasia (HAIGH & GIULIANO, 2000). A formação de novos vasos linfáticos, decorrente de fatores linfangiogênicos, relaciona-se também com o período de desenvolvimento da tumorigênese.

Existem alguns trabalhos que demonstram, através da impregnação de marcadores, o sistema linfático regional associado (PINHEIRO et al., 2003; SUGA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; MIYASHIRO et al., 2010). Até o momento, foram testados diferentes tipos de marcadores, sendo o azul de metileno estéril o mais comumente utilizado (PINHEIRO et al., 2003). Outros mais recentemente testados são o iopamidol (SUGA et al., 2007), a hemossiderina (PINHEIRO et al., 2009) e o verde de indocianina (MIYASHIRO et al., 2010). A marcação linfática torna-se importante em casos com neoplasias mamárias em cadelas, visando verificar o aparecimento de metástases em tecidos celulares e delimitar os vasos linfáticos e linfonodos regionais, facilitando assim as suas extirpações. Estudando-se o

sistema linfático mamário em cadelas saudáveis e com neoplasia com o emprego de azul de metileno estéril (intradérmico, sob o parênquima mamário), foi demonstrada neoformação vascular e linfática nesta espécie (PINHEIRO et al., 2003).

A linfadenectomia laparoscópica é uma técnica que vem sendo utilizada com frequência, na medicina, em pacientes com neoplasias malignas, nos quais os tumores são grandes e existe o envolvimento do linfonodo alvo (LAVERY et al., 2010). Assim, a laparoscopia possui papel prognóstico, utilizando-se da biópsia para determinação da evolução da doença, e também terapêutico, quando é realizada a retirada cirúrgica dos linfonodos e vasos linfáticos envolvidos (LAVERY et al., 2010). Há ainda a possibilidade de se realizar uma laparoscopia exploratória na cavidade abdominal, auxiliando também no diagnóstico de outros possíveis focos tumorais (FREEMAN & POTTER, 1999).

Um canino fêmea, SRD, com 12kg, 9 anos, apresentando tumores na cadeia mamária esquerda (glândula mamária abdominal medial “M4” e caudal “M5”), foi atendida e encaminhada pra realização da mastectomia radical unilateral esquerda. Foi coletado amostra de sangue para realização de hemograma completo e funções renal (uréia e creatinina) e hepática (ALT e AST), e os valores encontravam-se dentro dos limites fisiológicos para espécie.

A medicação pré-anestésica constou de acepromazina 0,2% (0,05mg/kg, IM) associada ao tramadol (3mg/Kg, IM). Administrou-se cefazolina sódica a 20% (20mg/kg, IV), e após 30 minutos, realizou-se a indução anestésica utilizando o propofol (5mg/Kg, IV), seguido da intubação orotraqueal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano 1% em oxigênio a 100% por meio de vaporizador universal em um fluxo de 0,08L/min. Administrou-se fluidoterapia com NaCl a 0,9% (10mL/Kg/h). O animal foi então posicionado em Trendelenburg de aproximadamente 30°. Foi aplicado 1mL do azul de metileno estéril (Figura 2.“A”) em três pontos ao redor da mama abdominal caudal esquerda, e então promoveu-se o massageamento, por 2 minutos, da região para facilitar a drenagem do

marcador linfático. Após 15 minutos da aplicação do marcador linfático (Figura 2."B"), iniciou-se o procedimento videolaparoscópico.

Na região pré-umbilical da linha média ventral, a distância de 1 cm da cicatriz umbilical, realizou-se incisão de pele de aproximadamente 11mm. Pela técnica aberta, foi inserido o primeiro trocarte (10mm), obtendo-se a insuflação de CO<sub>2</sub> medicinal (1L/min) até alcançar pressão intracavitária de 12mmHg. Sob visualização endoscópica (endoscópio de 0° e 10mm), elegeu-se as duas outras posições para introdução dos outros portais (Figura 2. "E"). A segunda punção foi realizada na parede abdominal esquerda (5mm), enquanto o terceiro acesso foi obtido na parede abdominal direita (10mm). Realizou-se a inspeção da cavidade abdominal, iniciando-se a linfadenectomia da região púbica esquerda, abrangendo a área do anel inguinal interno até os vasos epigástricos profundos (Figura 2. "C"). O tecido adiposo envolvendo o trajeto linfático foi dissecado e extirpado com pinça Kelly e tesoura Metzenbaum, sendo retirados da cavidade pelo portal de 10mm, com o auxílio de saco de coleta obtido com dedo de luva cirúrgica (Figura 2."D"). Após a verificação de ausência de hemorragia, partiu-se para OVH laparoscópica, utilizando os mesmos portais de acesso.

A OVH iniciou com a secção do ligamento suspensor esquerdo, seguida da cauterização bipolar, abrangendo o mesovário e o complexo arteriovenoso ovariano (CAVO). Promoveu-se a secção dessas estruturas com tesoura de Metzenbaum, incluindo o mesométrio e o ligamento redondo. As mesmas etapas foram repetidas no pedículo ovariano direito. Cranialmente a cérvix, realizou-se a oclusão dos vasos uterinos, utilizando quatro cliques de titânio tamanho médio. Seccionou-se então esta estrutura na porção mais cranial a cérvix utilizando tesoura de Metzenbaum e em seguida o útero e os ovários foram removidas pelo trocarte (10mm). Verificou-se a ausência de hemorragias, sendo a cavidade desinsuflada e as feridas de acesso suturadas. Empregou-se padrão Sultan na musculatura com fio poligalactina 910 2-0.



Após este segundo procedimento laparoscópico, partiu-se para realização da mastectomia total unilateral esquerda pela técnica aberta (Figura 2."F"). Foi realizada incisão elíptica na pele, ao redor da cadeia mamária, adotando-se margem em relação aos tumores de cerca de 2cm, aproveitando-se ainda a área das feridas utilizadas para o primeiro e segundo portais. Em seguida foi aplicada tração manual, com o auxílio de uma compressa úmida, sob o segmento cutâneo incisado, promovendo a ressecção do coxim gorduroso, dos linfonodos inguinais, glândulas mamárias e tumores. A hemorragia superficial foi controlada com o auxílio de eletrocoagulação monopolar. Isolou-se os vasos epigástricos superficiais e caudais, e foram aplicadas duas ligaduras com poligalactina 910 2-0. O tecido subcutâneo foi ocluído em padrão "walking suture" e a pele em padrão interrompido simples com náilon monofilamentar 4-0.

Após a recuperação anestésica, foi administrado meloxicam (0,2mg/kg, IM, s.i.d, por três dias) e tramadol (3mg/kg, SC, t.i.d, por 5 dias). O curativo foi obtido com micropore após instilação de Rifamicina (10mg/mL). O animal recebeu a alta hospitalar em dois dias, e ao final de 10 dias demonstrava cicatrização em primeira intenção. Após 60 dias, não se verificou recidiva da neoplasia. Os procedimentos duraram 45, 35 e 150 min., respectivamente.

Este relato reforça o uso do azul de metileno como marcador linfático em procedimentos cirúrgicos que envolvem neoplasmas mamários, sem danos aparentes ao animal, apesar de PINHEIRO et al. (2003) afirmarem possíveis complicações que possam ocorrer com sua utilização, como um caso de hipersensibilidade severa no local da aplicação, fato este não observado no presente relato. Uma opção para substituição deste corante sintético seria o uso da hemossiderina (sangue hemolisado), conforme em outro estudo de PINHEIRO et al. (2009), que obteve êxito em 100% dos animais ao comparar com o resultado positivo envolvendo 85% do grupo que utilizou o azul de metileno estéril. Outros marcadores que também poderiam ser estudados e utilizados, porém seu uso ainda é limitado, é o caso do iopamidol que segundo SUGA et al. (2007), o qual é identificado somente através da tomografia computadorizada,

e o verde de indocianina, que ainda em fase experimental, demonstrou resultados favoráveis em linfadenectomia laparoscópica da região pélvica MIYASHIRO et al. (2010).

O tempo de impregnação linfática de aguardado para coleta foi 15 minutos. Nos únicos dois microlinfonodos que foram coletados junto à gordura adjacente aos vasos ilíacos, não se constatou a presença azul de metileno, somente sendo observado o corante junto ao tecido neoplásico extirpado e linfonodo inguinal, conforme PINHEIRO et al. (2003) também constatou. Estudos futuros poderão ser realizados utilizando tempos diferentes de impregnação intradérmica com azul de metileno ou outros marcadores linfáticos, buscando-se melhores ferramentas para o estadiamento de neoplasia mamária em cadelas.

A linfadenectomia abdominal é uma técnica que vem sendo executada nos casos de neoplasias de vesícula urinária em humanos, onde a cistectomia geralmente também é recomendada conforme LAVERY et al. (2010). No presente relato, a linfadenectomia foi realizada associada à presença de neoplasias mamárias em uma cadela, permitindo a coleta de dois microlinfonodos, os quais não apresentavam alterações estruturais ou presença de células tumorais.

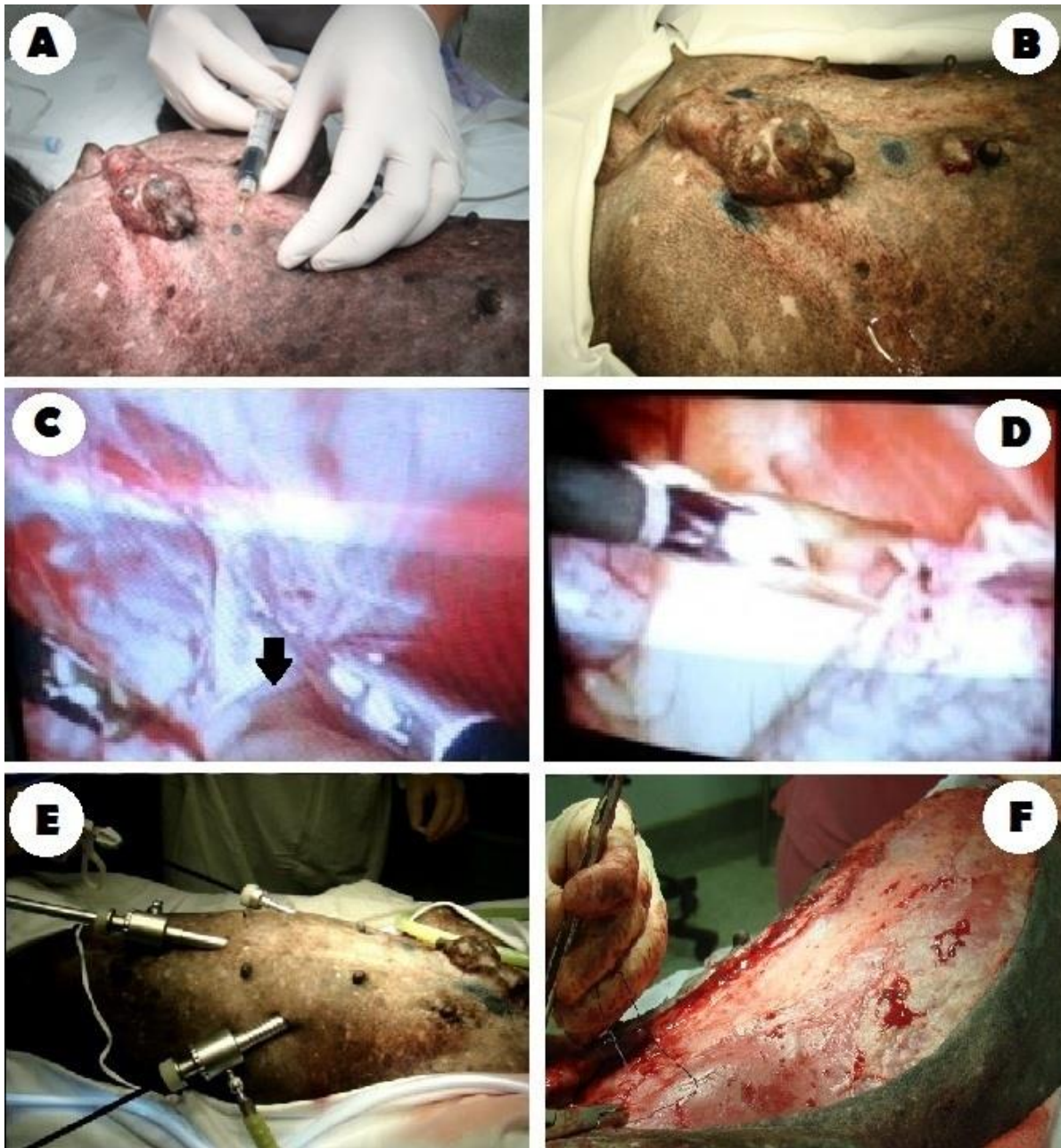
Com o presente estudo comprova-se que a linfadenectomia abdominal em cadelas é viável por laparoscopia, criando-se a possibilidade de aplica-lá em animais com neoplasia mamária para estadiamento tumoral. No conhecimento dos autores, essa proposta ainda não havia sido trazida para a rotina cirúrgica de pequenos animais.

## **REFERÊNCIAS**

1. FREEMAN, L.J. Minimally Invasive Surgery of the Hemolymphatic System. In: FREEMAN L.J.; POTTER, L. **Veterinary Endosurgery**, 1.ed. Mosby: 1999. p.192-204.

2. HAIGH, P.I.; GIULIANO, A.E. Role of sentinel lymph node dissection in breast cancer. **Annals of Medicine**, v.32, p.51–56, 2000. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07853890008995910> >. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.3109/07853890008995910.
3. LAVERY, H.J. et al. Robotic extended pelvic lymphadenectomy for bladder cancer with increased nodal yield. **British Journal of Urology**, v.107, p.1802-5, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Robotic%20extended%20pelvic%20lymphadenectomy%20for%20bladder%20cancer%20with%20increased%20nodal%20yield>>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09789.x.
4. MIYASHIRO, I. et al. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. **Surgical Endoscopy**. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976497>>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1007/s00464-010-1405-3.
5. PINHEIRO, L.G.P. et. al. Estudo Experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.545–552, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n6/a12v18n6.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2012.
6. PINHEIRO, L.G.P. et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.24, p.432-436, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502009000600002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502009000600002)>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1590/S0102-86502009000600002.
7. SCHRENK, P. et al. Morbidity Following Sentinel Lymph Node Biopsy versus Axillary Lymph node Dissection for Patients with Breast Carcinoma. **Cancer**, v.88, p.608–614, 2000. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10970142\(20000201\)88:3%3C608::AID-CNCR17%3E3.0.CO;2-K/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10970142(20000201)88:3%3C608::AID-CNCR17%3E3.0.CO;2-K/full) >. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 0.1002/(SICI)1097-0142(20000201)88.

8. SUGA, K. et al. Cutaneous drainage lymphatic map with interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography using iopamidol: preliminary results. **Lymphology**, v.40, p.63-73, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853616>>. Acesso em: 30 mai. 2012.



**Figura 2.** “A”, aplicação do azul de metileno estéril ao redor do tumor localizado na glândula mamária abdominal caudal esquerda e em “B” após 15 minutos da injeção intradérmica. “C”, trans-operatório da linfadenectomia abdominal esquerda, seta preta indicando a região lateral da artéria ilíaca interna e em “D” a cadeia de linfonodos sendo coletada e alojada no saco de coleta. “E”, portais videolaparoscópicos posicionados em triangulação para realização da linfadenectomia abdominal esquerda e ovário-histerectomia. “F”, trans-operatório da mastectomia radical unilateral esquerda.

## **5. TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

**Linfadenectomia inguinoilíaca laparoscópica, após impregnação linfática com diferentes marcadores em cadelas híginas**

**Laparoscopic inguinoiliac lymphadenectomy after impregnation with different lymphatic markers in healthy dogs**

**- ARTIGO CIENTÍFICO -**

### **RESUMO**

O sistema linfático mamário de animais saudáveis e neoplásicos é pouco estudado. De outra forma, sabe-se que as glândulas mamárias mais acometidas por neoplasmas são as inguinais. Atualmente existem poucos estudos em relação à drenagem linfática das glândulas mamárias em cadelas e inexistem respostas detalhadas quanto ao padrão de comunicação entre as cadeias linfáticas mamárias com as abdominais e pélvicas em animais sadios ou com neoplasmas na referida glândula. Por essa razão, pretendeu-se avaliar a ocorrência dessa comunicação linfática intrabdôminal, verificando também se a cadeia linfática inguinoilíaca poderia ser adequadamente abordada via cirurgia laparoscópica. Para tanto, os animais foram distribuídos, de forma randômica, em três grupos cirúrgicos: pacientes submetidos à técnica de coloração linfática com o corante azul de metileno estéril (G1); animais submetidos à técnica de impregnação linfática com o corante verde de indocianina (G2); animais submetidos à técnica de demarcação linfática utilizando solução fisiológica de NaCl a 0,9% (G3). Em todos os grupos foram realizados a aplicação intradérmica, do corante ou solução fisiológica, ao redor da mama inguinal direita, em tempos distintos de 12h ou 30min antes da incisão de pele. Após, foram coletadas por

videolaparoscopia duas regiões contendo tecido adiposo, laterais as artérias ilíacas interna e externas buscando avaliar a presença e o número de linfonodos extirpados. Por último, realizou-se a ovário-histerectomia eletiva pelos mesmos portais de acesso. Foram considerados ainda, o tempo de cirurgia e as complicações e dificuldades técnicas trans e pós-operatórias. A técnica proposta de linfadenectomia inguinoilíaca intrabdominal não obteve êxito na coleta de linfonodos. As técnicas de marcação linfática realizadas, utilizando tanto o azul de metileno a 1%, como o verde de indocianina a 1% não evidenciaram nenhuma marcação transoperatória nos tempos estudados. Em relação às complicações e dificuldades técnicas trans e pós-operatórias, observou-se em todos os animais reações de hipersensibilidade cutânea ao uso dos corantes. As técnicas propostas não apresentaram maiores dificuldades de execução ou complicações transoperatórias.

**Palavras chaves:** laparoscopia, metástase, drenagem linfática, linfonodo sentinela, cães.

## **ABSTRACT**

Mammary lymphatic system healthy and neoplastic animals is poorly studied, and it is known that the most affected are the inguinal mammary glands. Currently, there are few studies regarding the lymphatic drainage of the mammary glands in dogs and there are no answers about the communication pattern between mammary lymph nodes in the abdominal and pelvic in healthy animals or in that with gland neoplasms. For this reason, we intend to evaluate whether such communication occurs intrabdominal lymphatic and pelvic lymphatic chain can be addressed via laparoscopic surgery. The animals were separated randomly into three surgical groups: dogs underwent to lymphatic staining technique with sterile methylene blue dye (G1); animals underwent lymphatic impregnation technique with indocyanine green dye (G2); patient undergoing to lymphatic marking technique using saline solution of 0.9% NaCl (G3). In all groups, intradermal application of dye or saline around the right inguinal breast at different times

of 12 hours or 30 minutes before the skin incision was made. After, were collected by laparoscopy two regions containing adipose tissue - lateral internal and close to external iliac arteries - by assessing the presence and number of lymph nodes removed. The animal was undergone to ovariectomy by the same access portal. In this study, were even considered surgery time and complications and technical postoperative difficulties. The proposed technique intrabdominal iliac lymphadenectomy was not successful in collecting lymph nodes. For tagging technique lymphatic carried out using methylene blue 1% indocyanine green, and 1% non-fluorescent was no intraoperative marking. Regarding the complications and technical difficulties trans and postoperative was observed in all animals hypersensitivity reactions to the use of the dye. The proposed techniques, presented no technical difficulties in implementation and surgical complications.

**Key words:** laparoscopic, metastasis, lymphatic drainage, sentinel node, dogs.

## INTRODUÇÃO

O estudo da drenagem linfática visando o planejamento terapêutico dos neoplasmas mamários iniciou na medicina com *Henry François Le Dran*, no século XVIII, que descreveu uma possível propagação da doença por via linfática. *William Stewart Halsted*, no século XIX, desenvolveu a técnica de mastectomia total, através da ressecção dos músculos peitorais e do esvaziamento linfático dos linfonodos axilares. Este foi o primeiro tratamento que permitiu a curabilidade desta neoplasia (MOULIN, 1983).

As neoplasias mamárias em cadelas são tratadas principalmente por cirurgia, devido à possibilidade de malignidade tumoral e de ocorrência de metástase subsequente para outros órgãos. Realiza-se técnica de mastectomia radical, porém, recomenda-se realizar a extirpação dos linfonodos sentinelas, axilares e inguinais visando a impedir a disseminação de células tumorais e subsequentes



metástases (SCHRENK et al., 2007). Nessas situações, o sistema linfático desempenha papel importante, tanto no controle local tumoral como no mecanismo de transporte celular, sendo fator associado ao aparecimento de metástases em diversos tipos de neoplasia (HAIGH & GIULIANO, 2000). A formação de novos vasos linfáticos, decorrente de fatores linfangiogênicos, relaciona-se também com o período de desenvolvimento da tumorigênese.

Existem alguns trabalhos, tanto na medicina como na medicina veterinária, que demonstram, através da impregnação de corantes linfáticos, o sistema linfático regional associado às glândulas mamárias (PINHEIRO et al. 2003; SUGA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; MIYASHIRO et al., 2010). Diferentes tipos de marcadores foram testados, sendo o azul de metileno estéril o mais comumente utilizado (PINHEIRO et al., 2003). Outros marcadores testados são o iopamidol (SUGA et al., 2007), a hemossiderina (PINHEIRO et al., 2009) e o verde de indocianina (MIYASHIRO et al., 2010). Estudando-se o sistema linfático mamário em cadelas saudáveis e com neoplasia, com o emprego de azul de metileno estéril, foi demonstrada neoformação vascular e linfática nessa espécie (PINHEIRO et al., 2003). Assim, a marcação linfática torna-se muito importante em casos com neoplasias mamárias em cadelas, visando a verificar o aparecimento de metástases em tecidos celulares e delimitar os vasos linfáticos e linfonodos regionais, facilitando assim as suas extirpações.

A linfadenectomia laparoscópica é uma técnica que vem sendo utilizada com frequência, em pacientes com neoplasias malignas, na medicina, nos quais os tumores são grandes e existe o envolvimento do linfonodo alvo (LAVERY et al., 2010). Assim, a laparoscopia possui papel prognóstico - utilizando-se da biópsia para determinação da evolução da doença - e também terapêutico, quando é realizada a retirada cirúrgica dos linfonodos e dos vasos linfáticos envolvidos (LAVERY et al., 2010). Ainda, há a possibilidade de se realizar laparoscopia exploratória na cavidade abdominal, auxiliando também no diagnóstico de outros possíveis focos tumorais (FREEMAN & POTTER, 1999).

A ovário-histerectomia eletiva é a cirurgia mais amplamente realizada na medicina veterinária de pequenos animais (DAVIDSON et al., 2004), sendo considerada atualmente o melhor método no controle populacional de animais errantes, além de contribuir na prevenção de diversas patologias ovarianas e uterinas (FREEMAN & POTTER, 1999). Tradicionalmente, tal procedimento é realizado por celiotomia via linha média ventral, sendo esse procedimento associado à boa recuperação, porém com uma dor pós-operatória considerada moderada (HANCOCK, 2005; MAYHEW & BROWN, 2007). Outra modalidade que vem sendo utilizada com mesmo propósito cirúrgico é a videolaparoscópica (FREEMAN & POTTER, 1999), que apresenta como potenciais vantagens em relação à cirurgia convencional, tais como o acesso reduzido, a menor lesão tecidual, os menores desconforto e dor no pós-operatórias, a menor período de convalescença e os melhores resultados estéticos (MALM et al., 2004; DAVIDSON et al., 2004; DEVITT et al., 2005).

Este trabalho tem por objetivo avaliar a eficácia da técnica de linfadenectomia inguinoilíaca videolaparoscópica em cadelas híginas, proposta para duas regiões laterais aos vasos ilíacos (ilíaca interna e externa), após a marcação linfática utilizando os corantes azul de metileno a 1% e o verde de indocianina a 1% em diferentes tempos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas 15 cadelas, híginas aos exames clínico e hematológico, sem raça definida, não castradas, provenientes de entidades protetoras dos animais da cidade de Santa Maria – RS e de proprietários desafiados economicamente. O público-alvo foi baseado na possibilidade de benefício na realização das ovários-histerectomias sem quaisquer custos financeiros, visto que tais animais necessitavam ser operados para o controle populacional e que os procedimentos propostos reduziriam o risco de desenvolvimento de doenças uterinas e

ovarianas futuras. O experimento foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob protocolo 043/2013 e autorização por escrito dos responsáveis das instituições para a realização dos procedimentos

As cadelas foram avaliadas clinicamente quanto à coloração de mucosas, frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar, temperatura retal, auscultação cardíaca e pulmonar, palpação abdominal, palpação de linfonodos e grau de hidratação. No mesmo dia foi coletada uma amostra sanguínea para realização do hemograma e bioquímica sérica, a fim de comprovar a condição de higidez dos pacientes. Após atestar a normalidade em todos esses parâmetros, as cadelas foram alojadas em canis individuais, 24h antes da realização dos procedimentos, onde recebiam ração comercial balanceada e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos, de forma randômica, em três grupos cirúrgicos: seis submetidos à técnica de coloração linfática com o corante azul de metileno estéril (G1); seis submetidos à técnica de impregnação linfática com o corante verde de indocianina (G2); e três animais submetidos à técnica de impregnação linfática utilizando solução fisiológica de NaCl a 0,9% (G3). Os animais do G1 e G2 foram ainda subdivididos em dois grupos de três componentes cada, relacionados ao tempo de marcação linfática, a partir da aplicação do marcador linfático 12 horas ou 30 minutos do início do procedimento cirúrgico. Para a realização da técnica de marcação linfática, nos tempos supracitados, utilizou-se os corantes verde de indocianina e o azul de metileno estéreis, ambos utilizados na concentração de 1% e no volume de 0,5mL para os animais até 15Kg e 1mL para as cadelas acima de 15kg. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e tricotomizados na região da mama inguinal direita (quinta glândula mamária - m5d) e então era realizada antissepsia cirúrgica com clorexidina a 0,5% sobre a mesma região. Com a utilização de uma seringa de 1ml e agulha 13x4,5mm, o volume do corante

correspondente era aplicado de forma intradérmica distribuído em 5 pontos equidistantes circundando a m5d.

A técnica cirúrgica proposta para os três grupos foi inicialmente a realização da linfadenectomia pélvica videolaparoscópica direita, seguida da ovário-histerectomia pelos mesmos portais de acesso. Primeiramente foram realizados estes procedimentos em três animais do grupo piloto, para padronização das técnicas de linfadenectomia pélvica e ovário-histerectomia, os quais não foram incluídos nas avaliações pós-operatórias do presente estudo.

Todos os animais foram submetidos a jejum alimentar sólido de 12 horas e hídrico de duas horas. Os pacientes foram submetidos à tricotomia da região de abdômen ventral estendendo do apêndice xifóide ao púbis, e lateralmente às cadeias mamárias.

Foi instituída como medicação pré-anestésica acepromazina 0,2% ( $0.1\text{mg.Kg}^{-1}$ , i.m.) e tramadol 5% ( $3\text{mg.Kg}^{-1}$ , i.m.). Após 20 minutos da realização da medicação pré-anestésica, os pacientes foram induzidos com propofol a 1% ( $6\text{mg.Kg}^{-1}$ , i.v.) e mantidos com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100%, via inalatória, em circuito semi-fechado e ventilação assistida. Nos três grupos de cirurgia, os animais foram mantidos em fluidoterapia intravenosa com Solução Fisiológica de NaCl 0,9% ( $10\text{mg.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) e receberam como forma de profilaxia antimicrobiana ampicilina ( $20\text{mg.Kg}^{-1}$ , i.v.) aplicada 30 min. antes da incisão cutânea. A antisepsia foi realizada com clorexidina alcoólica a 0,5%. O tempo de cirurgia foi dividido da seguinte maneira: T1 - a partir da primeira incisão cutânea até o estabelecimento do acesso a cavidade peritoneal e inspeção inicial do abdômen mantendo-se os três portais de acesso abdominais; T2 - do início ao fim da técnica de linfadenectomia pélvica lateral direita (direita da a. ilíaca interna); T3 - do início ao fim da técnica de linfadenectomia pélvica lateral direita (esquerda da a. ilíaca interna); T4 - do início ao final da técnica de ovário-histerectomia

videolaparoscópica. O tempo total foi considerado desde a primeira incisão de pele até o última sutura de pele.

Na região umbilical da linha média ventral, foi realizada uma incisão de pele e tecido subcutâneo de aproximadamente 12mm. Por meio da técnica aberta, foi inserido o primeiro trocarte de 10mm, obtendo-se a insuflação de CO<sub>2</sub> medicinal (1,5L.min<sup>-1</sup>) até alcançar pressão intracavitária de 12mmHg. Sob a visão endoscópica, utilizando endoscópio de 0° e 10mm acoplado a microcâmera e à fonte de luz, foram escolhidas as duas outras posições para introdução dos outros portais (Figura 3. "A"). A segunda punção foi realizada na parede abdominal esquerda, utilizando trocarte de 5mm. O terceiro acesso foi obtido na parede abdominal direita, através de um trocarte de 10mm. Com o uso de um endoscópio rígido (0° e 10mm), realizou-se a inspeção da cavidade abdominal e na sequência iniciou-se a linfadenectomia inguinoilíaca direita, lateralmente aos vasos epigástricos profundos (Figura 3. "C"). Padronizou-se duas regiões de aproximadamente 2cm<sup>2</sup> para remoção do tecido adiposo superficial, adjacentes ao complexo arteriovenoso inguinoiliaco. Em relação à profundidade do plano de dissecação, adotou-se aproximadamente 1cm em direção ao canal femural do lado esquerdo dos vasos ilíacos, e também 1cm, a direita dos mesmo vasos, outra região foi coletada em direção ao canal inguinal direito (Figura 3. "D"). Estas amostras eram coletadas e separadas para que fossem encaminhadas para avaliação histopatológica, para avaliação da presença ou não de tecido linfático e também para possível quantificação do número médio de microlinfonodos de cada uma das regiões.

Imediatamente à direita da artéria ilíaca interna, no início da sua junção ao peritônio ventral, era dissecado o tecido adiposo adjacente utilizando pinça Maryland e tesoura de Metzenbaum. Para liberação do tecido dissecado foi utilizado pinça powerblade TM<sup>®</sup>, através de cauterização bipolar seguida de secção com a lâmina de corte. Com o auxílio de uma pinça de

preensão de Maryland o tecido era retirado, através de saco de coleta confeccionado com dedo de luva, pelo trocarte de 10mm. Utilizando esta mesma técnica, o quadrante esquerdo aos vasos ilíacos profundos também foi dissecado e coletado.

Pelos mesmos portais de acesso, ainda em decúbito, dorsal a ovário-histerectomia iniciava-se com a elevação da porção cranial da cérvix, utilizando pinça Kelly, para que pudesse ser executada duas aberturas no ligamento largo do útero, paralelo às duas artérias uterinas. Em seguida, utilizava-se a pinça powerblade TM<sup>®</sup> para hemostasia bipolar e secção da junção entre a cérvix e o início do corpo do útero. Após esta etapa, os animais eram posicionados em decúbito lateral esquerdo (Figura 3. "B") para promover o descolamento das vísceras para o lado contralateral e facilitar o acesso adequado à região do mesovário direito. Com o auxílio de uma pinça de Maryland, a região do ligamento próprio do ovário era apreendida e elevada junto a parede abdominal lateral e então uma sutura trans-parietal, utilizando fio de polipropileno 2 e agulha de 4cm, era posicionada para fixação temporária do ovário correspondente (Figura 3. "E"). Com o auxílio da pinça powerblade TM<sup>®</sup>, era procedida a dissecção caudalmente ao complexo arterio-venoso ovariano e então realizava-se a cauterização bipolar seguida de secção até a região limite com o ligamento suspensor do ovário (Figura 3. "F"). As mesmas etapas eram realizadas na região do ovário contralateral mediante mudança de decúbito para lateral direito. Após a completa cauterização e secção da artéria e veia ovárica esquerdas o animal era reposicionado em decúbito dorsal e a região do ligamento suspensório rente a bolsa ovárica esquerda era apreendida, utilizando-se para tanto pinça de Kelly com cremalheira. Removia-se então o ovário, seguido do corno uterino direito, corpo do útero e corno uterino e ovário esquerdo, pelo portal de 10mm localizado na parede abdominal direita. Verificava-se quanto a presença de hemorragia abdominal e na ausência desta condição, a cavidade abdominal era desinsuflada e as feridas de acesso suturadas. Para a camada muscular utilizou-se o padrão sultan

e fio poligalactina 910 2-0. Na sutura cutânea foi empregado padrão colcheiro horizontal e fio de náilon monofilamentar 4-0.

Ao término de todos os procedimentos cirúrgicos, foi realizado o curativo da feridas de acesso e todos os animais receberam terapia antiinflamatória com meloxicam a 0,2% ( $0,2\text{mg.Kg}^{-1}$ , s.c., s.i.d) e tramadol 5% ( $3\text{mg.Kg}^{-1}$ , s.c., t.i.d.), seguida por mais três dias. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais permaneceram em observação, recebendo fluidoterapia até a plena recuperação anestésica.

Em todos os pacientes se observou reação de hipersensibilidade 12horas após a aplicação dos corantes de forma intradérmica. Para estes casos, adotou-se protocolo diário de aplicação de gelo no local da inflamação por 10minutos, perfazendo duas seções diárias, e aplicação de pomada de escina  $10\text{m/g}$  e salicilato de dietilamonio  $50\text{mg.g}^{-1}$ , aplicadas duas vezes ao dia até a completa melhora do quadro de hipersensibilidade. Um dos animais apresentou necrose tecidual dois dias após a aplicação do corante verde de indocianina a 1%. Neste caso, instituiu-se antibioticoterapia utilizando enrofloxacino ( $5\text{mg.Kg}^{-1}$ , v.o., b.i.d.), seguido por mais sete dias, terapia anti-inflamatória utilizando prednisona ( $0,5\text{mg.Kg}^{-1}$ , v.o., b.i.d.) seguido por mais cinco dias e limpeza das feridas utilizando solução de NaCl a 0,9% e aplicação de pomada de escina ( $10\text{m.g}^{-1}$ , b.i.d.) e salicilato de dietilamonio ( $50\text{mg.g}^{-1}$ , b.i.d.).

As cadeias de tecido adiposo extirpadas foram adequadamente acondicionadas em solução de formol a 10% e encaminhadas para avaliação histopatológica. Para realização da histologia do tecido adiposo da região pélvica, o material foi primeiramente avaliado macroscopicamente. As peças de maior espessura foram seccionadas em duas partes iguais para melhor aproveitamento dos cortes. O material foi processado rotineiramente para histologia e incluído em blocos de parafina. Foram realizados cortes seriados de  $3,0\ \mu\text{m}$  de espessura, da maior parte do fragmento,

em intervalos de aproximadamente 500 µm (em torno de três cortes de cada peça). As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e observadas em microscópio óptico.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Pela avaliação histopatológica, os fragmentos de tecido adiposo pélvico das 15 cadelas (lado direito e esquerdo, especificamente) em questão pesaram entre 0,1g e 0,38g e mediam entre 0,5x0,2x0,2cm e 3,5x2,0x1,5cm, aproximadamente. Eram constituídos predominantemente de tecido amarelo-claro e brilhante, entremeado de pequenas áreas brancacentas, por vezes avermelhadas (interpretado como vasos sanguíneos) (Figura 4. “B”). Não foram evidenciadas estruturas semelhantes a linfonodos à palpação e inspeção visual. Histologicamente, os cortes foram constituídos predominantemente de um manto de células grandes e bem diferenciadas, com citoplasma abundante e intensamente vacuolizado, com limites bem distintos. O núcleo dessas células estava deslocado para a periferia, sendo redondo e formado por cromatina agregada (adipócitos) (Figura 4. “A”). Em meio ao tecido adiposo havia pequenos vasos sanguíneos de diversos calibres. Nas bordas da maioria dos cortes observa-se perda da arquitetura tecidual com distorção dos adipócitos (interpretado como artefato de manipulação resultante da coleta do material – sem significado clínico). Não foram observados linfonodos ou qualquer acúmulo linfóide em todas as amostras.

SOUZA et al. (2013) realizaram a mesma técnica de linfadenectomia pélvica, porém somente do lado esquerdo, em uma cadela apresentando neoplasias mamárias em glândulas abdominal caudal e inguinal. Foi realizada a aplicação intradérmica do corante azul de metileno a 1% ao redor do maior tumor localizado na glândula mamária inguinal e foram isolados dois microlinfonodos da região extirpada, contudo sem distinção da presença do corante nessas estruturas.



No presente trabalho não foi isolado nenhum linfonodo nessa região. Essa condição pode ter ocorrida pelo fato da técnica de linfadenectomia ter sido executada na cadeia pélvica contralateral em animais sem a formação neoplásica em glândulas mamárias, ao contrário do realizado no relato supracitado. Acredita-se que outro fator que possa ter influenciado foi que possivelmente o plano de dissecação adjacente aos valos ilíacos profundos não incluiu regiões que continham linfonodos, tornando necessário estender ainda mais a linfadenectomia. Outra possibilidade é que existam microlinfonodos, mas como os mesmos não estavam reativos, acabaram não sendo localizados para inclusão nos cortes histológicos.

Ressalta-se a importância de novos estudos visando delimitar melhor as regiões indicadas para a coleta, além da comparação dos mecanismos de drenagem linfática de animais portadores de neoplasmas mamários e de animais hígdidos, já que a existência de microlinfonodos nessa região já foi previamente comprovada (SOUZA et al., 2013).

Quanto ao menor volume de amostra do lado direito, acredita-se que isso se deve à posição anatômica dificultar a colheita de amostras, pois se situa entre os aneis inguinal e femoral, região demarcada pela presença de rica vascularização. Entretanto, a utilização da pinça bipolar powerblade possibilitou segurança na cauterização bipolar dos vasos sanguíneos pertencentes às áreas de coleta propostas para linfadenectomia bem como para cauterização do complexo artério venoso ovariano e das artérias uterinas, semelhantes a segurança descrita do trabalho de MACHADO-SILVA et al. (2012).

O uso dos corantes azul metileno e verde de indocianina demonstraram certa toxicidade em todos pacientes nos locais de aplicação, já que não houve a extirpação cirúrgica do tecido corado, ao contrário do que se faz em casos de marcação previamente à mastectomia. Tais sinais incluíram necrose de pele (Figura 4. “D”), em dois animais pertencentes ao grupo onde se utilizou o verde de indocianina a 1% e calosidade e eritema da pele (Figura 3. “C”), condizentes

com sinais de hipersensibilidade do tipo IV em todos os outros animais, em que foi utilizado a aplicação dos corantes, semelhante aos que PINHEIRO et al. (2003) e CARVALHO-CAMPOS et al. (2007) relataram em alguns animais. A dose e concentração utilizada dos corantes azul de metileno estéril e verde de indocianina necessitam serem ajustadas e melhor estudadas para tentar minimizar os efeitos colaterais em cães, principalmente para os casos onde o tecido linfático impregnado não seja removido cirurgicamente. Também se evidenciou que é necessário verificar quanto à segurança do uso de tais corantes nessas condições.

As médias e desvios padrão dos tempos de duração das cirurgias em minutos foram:  $18,06 \pm 5,40$  para o acesso cirúrgico (T1);  $19,33 \pm 5,47$  para linfadenectomia pélvica direita (T2);  $26,53 \pm 6,36$  para linfadenectomia pélvica esquerda (T3);  $35,06 \pm 5,70$  ovário-histerectomia (T4) e  $98,88 \pm 7,82$  para a média da soma dos procedimentos. Ressalta-se que a tempo cirúrgico em videocirurgia tende a reduzir conforme a curva de aprendizagem da técnica vai sendo alcançada (DAVIDSON et al., 2004; MALM et al., 2004). O cirurgião desse experimento possuía experiência consolidada em relação ao acesso à cavidade peritoneal e para a ovário-histerectomia videolaparoscópica, porém estava na fase inicial da curva de aprendizagem para as técnicas de linfadenectomia direita e esquerda da cadeia de linfonodos pélvicos, condição que certamente influenciou no tempo operatório.

## **CONCLUSÃO**

O modelo proposto de linfadenectomia videolaparoscópica não possibilitou a coleta de linfonodos das regiões laterais (esquerda e direita) aos vasos epigástricos profundos (artéria ilíaca interna e externa) em animais hípidos.

A técnica de marcação linfática, utilizando os tempos de 12h e 30min antes do início do procedimento cirúrgico, utilizando o azul de metileno estéril a 1% e o verde de indocianina a 1%, não permitiu a delimitação visual de vasos linfáticos e linfonodos intra-abdominal das regiões da cadeia abdominal e pélvica.

As cirúrgicas realizadas via abordagem laparoscópica, não apresentaram maiores dificuldades técnicas e se mostraram seguras para sua execução.

### **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Santa Maria;  
Protocolo de aprovação 043/2013.

### **REFERÊNCIAS**

1. BRUN, M.V. et al. Ovário-histerectomia em caninos por cirurgia laparoscópica. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37, n.6, p480-5, 2000.
2. CAMPOS, M.L.C. et al. Pesquisa do linfonodo sentinela (LNS) através da administração de corante azul de metileno em cães portadores de neoplasias. **Revista Nosso Clínico**, v.10, n.56, p.18-34, 2007.
3. DAVIDSON, E.B. et al. Comparison of laparoscopic ovariohysterectomy and ovariohysterectomy in dogs. **Veterinary Surgery**, v.33, p.62-69, 2004.
4. DEVITT, C.M. et al. Duration, complications, stress, and pain of open ovariohysterectomy versus a simple method of laparoscopic-assisted ovariohysterectomy in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n.6, p.921-927, 2005.

5. FREEMAN, L.J. Minimally Invasive Surgery of the hemolymphatic system. **Veterinary Endosurgery**, v.1, p.192-204, 1999. In: FREEMAN, L.J.; HENDRICKSON, D.A. (Eds), Mosby, St Louis.
6. HAIGH, P.I.; GIULIANO, A.E. Role of sentinel lymph node dissection in breast cancer. **Annals of Medicine**, v.32, p.51–56, 2000.  
Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/07853890008995910> >. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.3109/07853890008995910.
7. HANCOCK, R.B. Comparison of postoperative pain following ovariohysterectomy via harmonic scalpel-assisted laparoscopy versus traditional celiotomy in dogs. (Tese de Doutorado). **Veterinary Medical Sciences**, Blacksburg, 2005.
8. LAVERY, H.J. et al. Robotic extended pelvic lymphadenectomy for bladder cancer with increased nodal yield. **British Journal of Urology**, v.107, p.1802-5, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Robotic%20extended%20pelvic%20lymphadenectomy%20for%20bladder%20cancer%20with%20increased%20nodal%20yield>>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09789.x.
9. MALM, C. et. al. Ovário-histerectomia: estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópica e aberta na espécie canina. Intra-operatório I. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.457-466, 2004.
10. MAYHEW, P.D.; BROWN, D.C. 2007. Comparison of three techniques for ovarian pedicle hemostasis during laparoscopic-assisted ovariohysterectomy. **Veterinary Surgery**, v.36, p.541-547, 2007.
11. MOULIN, D. The short history of breast cancer. **Kluwer: Academic Publishers**; 1983.
12. MIYASHIRO, I. et al. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. **Surgical Endoscopy**. 2010. Disponível em:

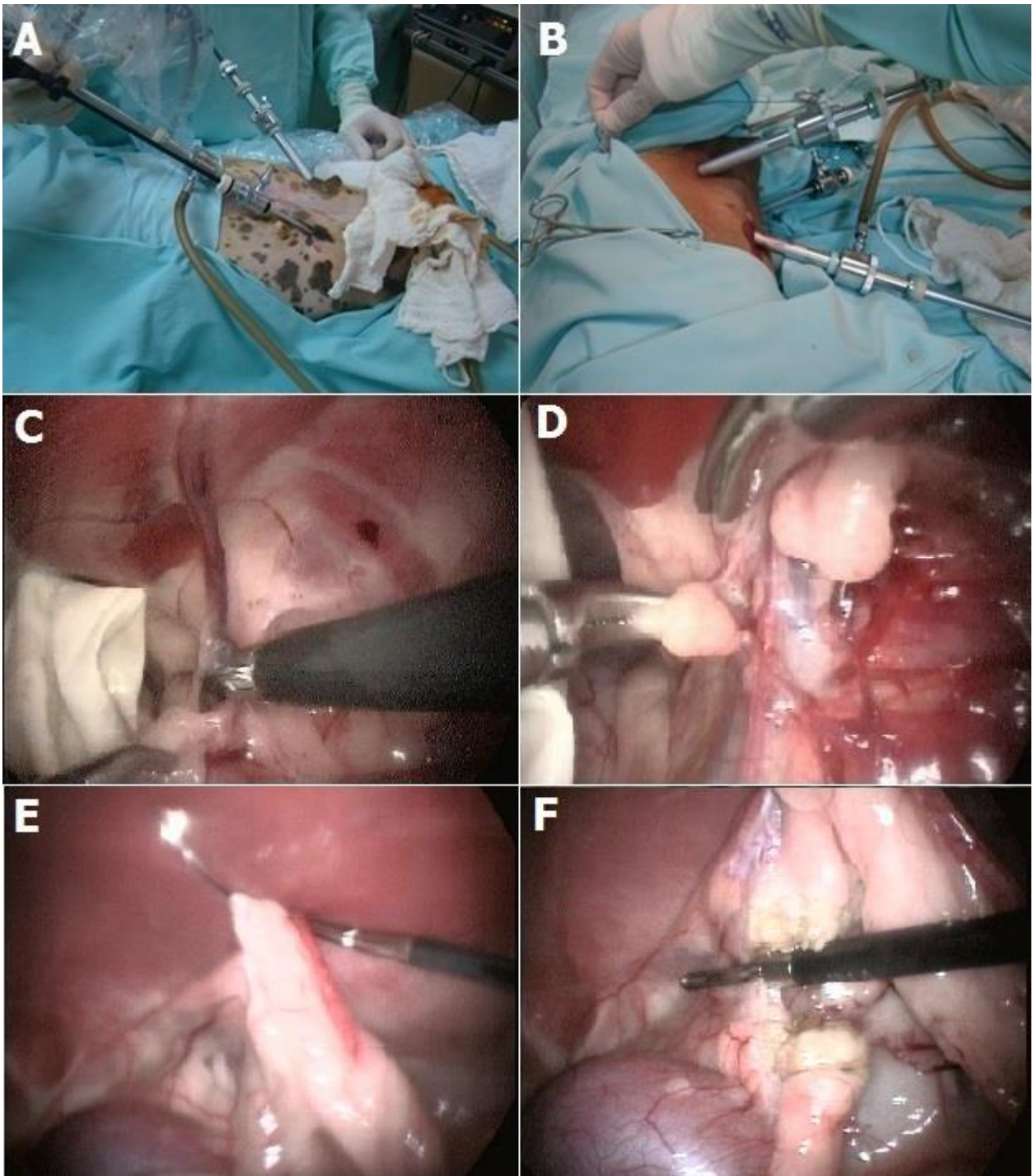
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976497>>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1007/s00464-010-1405-3.

13. PINHEIRO, L.G.P. et al. Estudo Experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.545–552, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n6/a12v18n6.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2012 .

14. PINHEIRO, L.G.P. et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.24, p.432-436, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502009000600002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502009000600002)>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1590/S0102-86502009000600002.

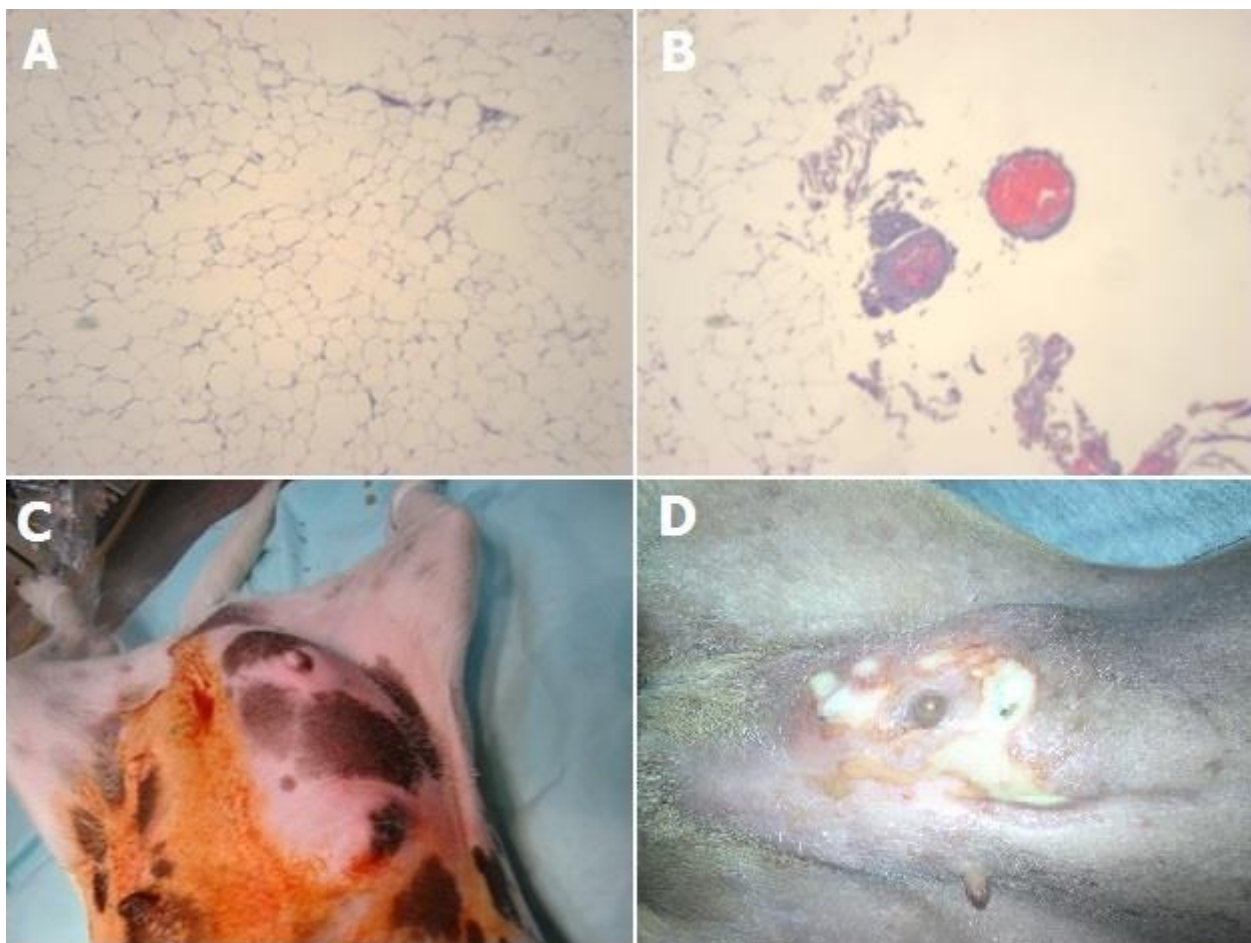
15. SCHRENK, P. et al. Morbidity Following Sentinel Lymph Node Biopsy versus Axillary Lymph node Dissection for Patients with Breast Carcinoma. **Cancer**, v.88, p.608–614, 2000. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10970142\(20000201\)88:3%3C608::AID-CNCR17%3E3.0.CO;2-K/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10970142(20000201)88:3%3C608::AID-CNCR17%3E3.0.CO;2-K/full) >. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 0.1002/(SICI)1097-0142(20000201)88.

16. SOUZA, F.W. et al. Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. **Ciência Rural**, v.43, p.750-3, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a11913cr2012-0376.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2014.



**Figura 3.** Linfadenectomia videolaparoscópica e marcação linfática em cadelas. Em “A”, disposição dos três portais de videocirurgia para realização da técnica de linfadenectomia videolaparoscópica com o animal em decúbito dorsal. Em “B”, posicionamento dos trocartes para execução da técnica de ovário-histerectomia videolaparoscópica com o paciente em

**Continuação figura 3:** decúbito lateral esquerdo. Em “C” e “D”, regiões laterais esquerda e direita paralelas aos vasos ilíacos internos, propostas para realização da técnica de linfadenectomia inguinoilíaca laparoscópica. Em “E”, etapa realizada durante a ovário-histerectomia para elevação do ovário e exposição do complexo artério-venoso ovariano através de sutura transparietal. “F”, cauterização bipolar seguida de secção com a pinça “powerblade TM®”.



**Figura 4.** Exame histopatológico do tecido adiposo perivascular coletado por videolaparoscopia no intuito de obter biopsia de microlinfonodos. Em “A”, células grandes e bem diferenciadas, com citoplasma abundante e intensamente vacuolizado (adipócitos). Em “B”, tecido adiposo

**Continuação figura 4:** amarelo-claro e brilhante, entremeado de pequenas áreas brancacentas, por vezes avermelhadas (interpretado como vasos sanguíneos). Em “C” e “D”, reações de hipersensibilidade intradérmica e necrose provocadas após a aplicação do corante verde de indocianina a 1%. e do azul de metileno a 1%, ambas em região periglandular mamária inguinal direita.



## 6. DISCUSSÃO

Por meio destes estudos foi possível observar que a técnica de marcação linfática através do uso dos corantes, verde de indocianina a 1% e azul de metileno a 1%, foi eficaz na delimitação linfática peritumoral regional, conforme SOUZA et al. (2013) realizaram através do uso do azul de metileno a 1% em uma cadela com neoplasma mamário.

Entretanto, ainda são necessários novos estudos para verificar a possível comunicação da cadeia mamária de animais apresentando neoplasmas com as cadeias abdominais e pélvicas de linfonodos intrabdominais, pois segundo PEREIRA et al. (2003) e PINHEIRO et al. (2009) observaram, os fatores linfangiogênicos em decorrência das neoplasias podem gerar comunicações linfáticas diferentes das observadas em animais hígidos sem a presença de neoplasmas mamários.

A técnica de linfadenectomia videolaparoscópica proposta no experimento 3 não permitiu a biopsia de linfonodos nas regiões laterais aos vasos epigástricos profundos, porém SOUZA et al. (2013) realizaram técnica semelhante de linfadenectomia inguinoilíaca e isolaram dois linfonodos através do exame histopatológico. Tais linfonodos não continham a impregnação do corante azul de metileno, utilizado na marcação linfática da glândula mamária inguinal direita. Este fato pode ter ocorrido pelo fato da região abordada para linfadenectomia inguinoiliaca, no experimento 3, ser mais ventral em relação ao executado no trabalho 2.

Outra questão também importante é o fato dos animais utilizados no relato 2 apresentarem neoplasmas mamários, diferente do executado no presente trabalho, onde todos os animais eram hígidos e sem envolvimento neoplásico das glândulas mamárias.

Não houve marcação linfática intra-abdominal utilizando os corantes azul de metileno a 1% e verde de indocianina a 1%, em regiões de cadeia abdominal e pélvica de linfonodos ou vasos linfáticos durante os tempos estudados, fato este observado por MIYASHIRO et al. (2011) durante técnica semelhante para ressecção de tumores gástricos utilizando o corante verde de indocianina. No presente trabalho a escolha do corante verde de indocianina se deu pela capacidade do mesmo em delimitar o tecido linfático regional apresentando-se de forma fluorescente à luz do endoscópio. Com isso a ressecção cirúrgica da cadeia linfática tornaria-se mais eficiente. Como não ocorreu a marcação linfática intrabdominal, também não foi possível avaliar se os tempos de aplicação do corante foram efetivos para que houvesse a delimitação do tecido linfático pélvico.

## 7. CONCLUSÃO

É necessário a realização de novos experimentos em relação ao tempo de aplicação dos corantes, possíveis adequações quanto à posologia de administração dos marcadores linfáticos, e extensão da região de coleta de linfonodos da cadeia abdominal e pélvica de animais hípidos e com neoplasmas mamários. Isso porque observa-se divergência em relação aos resultados encontrados nos três estudos.

A linha de pesquisa referente ao esvaziamento linfático pós marcação linfática intradérmica peritumoral na medicina está bastante desenvolvida, porém mais estudos necessitam ser realizados afim de conhecer melhor as características de disseminação de metástases através de vias linfáticas não antes estudadas em cadelas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASSALI et al. 2011. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v.4, n.2, p.153-180, 2011.
2. COELHO-OLIVEIRA, A. et al. Identificação do linfonodo sentinela no câncer de mama com injeção subdérmica periareolar em quatro pontos do radiofármaco. **Radiologia Brasileira**, v. 37, n.4, jul/ago, 2004. Doi: 10.1590/S0100-39842004000400004.
3. DANGLE et al. How do commonly performed lymphadenectomy templates influence bladder câncer nodal stage? **The Journal of Urology**, v.183, p.499-504, 2010. Doi: 10.1016/j.juro.2009.09.080.
4. FERRI, S.T.S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, v.131, n.22, p.64-67, 2003.
5. FIDLER, I.J.; BRODEY, R.S. A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.151, p.710-725, 1967
6. FOSSUM, T.W. 2005. Cirurgia dos sistemas reprodutivo e genital, v.3, p.610-617. In: FOSSUM, T.W. (Ed.), **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca.
7. HANCOCK, R.B. Comparison of postoperative pain following ovariohysterectomy via harmonic scalpel-assisted laparoscopy versus traditional celiotomy in dogs. (Tese de Doutorado). **Veterinary Medical Sciences**, Blacksburg, 2005.
8. LAVERY, H.J. et al. Robotic extended pelvic lymphadenectomy for bladder cancer with increased nodal yield. **British Journal of Urology**, v.107, p.1802-5, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Robotic%20extended%20pelvic%20lymphadenectomy%20for%20bladder%20cancer%20with%20increased%20nodal%20yield>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09789.x.

9. MACHADO-SILVA, M.A. et al. Pure-transvaginal NOTES ovariohysterectomy in bitches: a preliminary feasibility study. **Ciência Rural (UFMS. Impresso)**, v. 42, p. 1237-1242, 2012.
10. MALM, C. et. al. 2004. Ovário-histerectomia: estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópica e aberta na espécie canina. Intra-operatório I. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.457-466, 2004.
11. MAYHEW, P.D.; BROWN, D.C. Comparison of three techniques for ovarian pedicle hemostasis during laparoscopic-assisted ovariohysterectomy. **Veterinary Surgery**. v.36, p.541-547, 2007.
12. MIYASHIRO, I. et al. 2011. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. **Surgical Endoscopy**, v.25, n.5, p.1672-1676. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976497>>. Acesso em: 30 maio, 2012. doi: 10.1007/s00464-010-1405-3.
13. O'KEFFE, D.A. Tumores do sistema genital e das glândulas mamárias. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, v.2, p.2344-2351, 1997.
14. 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.228-34, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16836586>>. Acesso em: 17 jan. 2014. DOI: 10.1111/j.1439-0264.2005.00664.x
15. 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. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x/abstract>>. Acesso em: 17 jan. 2014. DOI: 10.1046/j.1439-0264.2003.00485.x

16. PINHEIRO, L.G.P. et al. Estudo Experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, p.545–552, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n6/a12v18n6.pdf>>. Acesso em: 30 mai. 2012 .
17. PINHEIRO, L.G.P. et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.24, p.432-436, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502009000600002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502009000600002)>. Acesso em: 30 mai. 2012. doi: 10.1590/S0102-86502009000600002.
18. QUADROS, L. G. DE A.; GEBRIM, L. H. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer demama na prática clínica do ginecologista brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 3, 2007.
19. QUEIROGA, L.; LOPES, F. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores prognósticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, p.119-27, 2009.
20. SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, n.6, p.1112–1131, 2011.
21. SOUZA, F.W. et al. Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. **Ciência Rural**, v.43, p.750-3, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/2013nahead/a11913cr2012-0376.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2014.
22. SUGA, K. et al. Cutaneous drainage lymphatic map with interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography using iopamidol: preliminary results. **Lymphology**, v.40, p.63-73, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853616> >. Acesso em: 30 mai. 2012.