

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

João Pedro Scussel Feranti

**LINFADENECTOMIA DOS ILÍACOS MEDIAIS EM CADELAS COM  
NEOPLASMAS MAMÁRIOS**

Santa Maria, RS  
2018

**João Pedro Scussel Feranti**

**LINFADENECTOMIA DOS ILÍACOS MEDIAIS EM CADELAS COM NEOPLASMAS  
MAMÁRIOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Veloso Brun

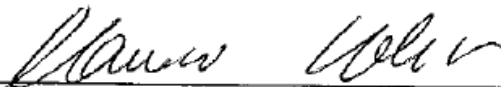
Santa Maria, RS  
2018

João Pedro Scussel Feranti

**LINFADENECTOMIA DOS ILÍACOS MEDIAIS EM CADELAS COM NEOPLASMAS  
MAMÁRIOS**

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

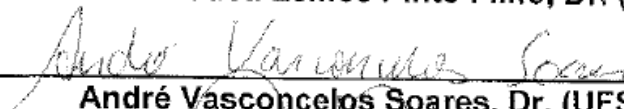
**Aprovado em 11 de maio de 2018:**



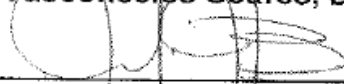
**Maurício Veloso Brun, Dr. (UFSM) - Videoconferência**  
(Presidente/Orientador)



**Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Dr. (UFSM)**



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



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



**Fabíola Dalmolin, Dr. (UFFS)**

Santa Maria, RS  
2018

## DEDICATÓRIA

*A minha família e a minha noiva Marília Teresa de Oliveira, por todo apoio.*

## AGRADECIMENTOS

O encerramento desta etapa teve o auxílio de diversas pessoas. Muito obrigado a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista, em especial:

- ao meu orientador, professor Maurício Veloso Brun, pela amizade e companheirismo durante todos esses anos de convivência, muito obrigado por me incentivar e acreditar no meu trabalho;

- aos meus pais e minha irmã, que sempre acreditaram e apoiaram minhas decisões. Obrigada pela confiança que sempre depositaram em mim;

- a todos os meus familiares, principalmente a tia Bea, minha mãezona e meu tio Jorge, meu anjo da guarda;

- a Marília, meu amor, companheira para tudo, que me ensinou a ser uma pessoa mais compreensível. Te amo!;

- ao “Alfred” e a “Bundinha”, meus gatos, que embora pareçam “exaustos” todos os dias, são companheiros para toda hora;

- a Mairi, e todos os funcionários do Hospital Veterinário, por toda ajuda na realização, não só desse, como de todos os projetos e cirurgias;

- a todos os professores, que me ajudaram nessa caminhada;

- aos amigos de pós-graduação e em especial a grande família SOMIV pela amizade e apoio durante esse período;

- ao CNPq e Hospital Veterinário da UFSM pelo suporte financeiro para execução do projeto.

## RESUMO

### LINFADENECTOMIA DOS ILÍACOS MEDIAIS EM CADELAS COM NEOPLASMAS MAMÁRIOS

AUTOR: João Pedro Scussel Feranti  
ORIENTADOR: Maurício Veloso Brun

Os objetivos desse estudo foram verificar a eficácia da técnica de marcação linfática para o linfonodo ilíaco medial em cadelas com neoplasma mamário, utilizando o corante azul de metileno em diferentes locais de administração (intrauterino e intradérmico) e determinar se existe o acometimento nesse tecido linfático, permitindo assim estabelecer se a linfadenectomia dos ilíacos mediais é importante nestes pacientes. Foram incluídas 38 cadelas, com peso médio de  $10,7 \pm 4,2$  Kg, de  $9,9 \pm 2,5$  anos, com neoplasmas mamários em diferentes mamas, ulcerados ou não. As cadelas foram distribuídas em dois grupos (GI e GU). No GU (17 animais), realizou-se marcação linfática com corante administrado via intrauterina, seguido da exérese do linfonodo ilíaco medial ipsilateral ao neoplasma, OVH e mastectomia unilateral. No GI (21 animais), realizou-se a OVH seguida da marcação linfática com corante administrado via intradérmica (ao redor de M5) e subsequente linfadenectomia do ilíaco medial e posterior mastectomia unilateral. Em todos os animais utilizou-se o corante azul de metileno 1%. No GU, em 14 animais identificou-se os ilíacos marcadamente corados em azul, porém em três animais, os mesmos não foram corados, sendo extirpados da mesma forma após sua localização. No GI, em todos os animais a visualização dos linfonodos ilíacos mediais corados em azul foi efetivada até um minuto da aplicação. Após análise histopatológica dos neoplasmas mamários, 84,21% eram malignos (32 animais). Não houve metástases nos animais com neoplasma benigno. Das 32 cadelas com neoplasma maligno, foi verificada metástase de neoplasma mamário no linfonodo ilíaco medial em três animais do GI e em dois do GU, totalizando envolvimento dos referidos linfonodos em 15,62% dos pacientes. Em dois animais com metástase no linfonodo ilíaco medial, o mesmo não apresentava-se aumentado. Todos os linfonodos que apresentaram metástase de neoplasma mamário foram corados com azul de metileno. O presente estudo apresenta importantes inovações associadas ao manejo cirúrgico de neoplasma mamário em cadelas, demonstrando a efetividade da marcação dos linfonodos ilíacos com azul de metileno a 1%, principalmente quando administrado por via intradérmica, bem como ressalta quanto à importância da linfadenectomia pélvica medial em cadelas portadoras dessa afecção. Frente aos resultados alcançados, indica-se que a linfadenectomia dos ilíacos mediais ipsilaterais a cadeia mamária acometida por neoplasia faça parte do tratamento de caninos com neoplasmas mamários e que serão submetidos à celiotomia para OVH ou por outra indicação, independente do tamanho, localização e apresentação desses linfonodos.

**Palavras-chave:** Metástase. Linfonodo sentinela. Marcador linfático. Mastectomia. Canino.

## ABSTRACT

### MEDIAL ILIAC LYMPHADENECTOMY IN BITCHES WITH MAMMARY NEOPLASMS

AUTHOR: João Pedro Scussel Feranti  
Doctoral Supervisor: Maurício Veloso Brun

The objective of this study was to verify the effectiveness of the lymphatic marking technique for the medial iliac lymph node in bitches with mammary neoplasm, using the methylene blue pigment in different application sites (intrauterine and intradermal) and determine if there is lymphatic tissue affected, allowing to establish if the lymphadenectomy of the medial iliacs is important in patients with mammary neoplasm. Thirty-eight bitches were included in the study. The weigh  $10.7\pm 4.2$  kg and  $9.9\pm 2.5$  years old, with mammary neoplasms in different sites, ulcerated or not. Bitches were separated into two groups (GI and GU). In GU (17 animals), lymphatic marking was performed with intrauterine dye followed by medial iliac lymphadenectomy on the same side of the neoplasm, ovariohysterectomy and unilateral mastectomy. In GI (21 animals), ovariohysterectomy was performed followed by lymphatic marking with dye administered intradermally (around M5) and subsequent medial iliac lymphadenectomy and subsequent unilateral mastectomy. All animals received 1% methylene blue as dye. In GU, in 14 animals the iliac lymph nodes were stained by methylene blue, but in three animals, they were not stained and were excised in the same way after their location. In GI was possible to visualize in all animals the mediated iliac lymph nodes in blue until one minute after the application. Later histopathological analysis of mammary neoplasms, 84.21% were classified as malignant (32 animals). There were no metastases in the animals with benign neoplasm. In 32 bitches with malignant neoplasm, metastasis of mammary neoplasm in the medial iliac lymph node was verified in three GI animals and in two of the GU, totalizing involvement of the referred lymph nodes in 15.62% of these patients. In two animals with medial iliac lymph node metastasis, it was not increased in volume. All lymph nodes that presented mammary neoplasm metastasis were stained with methylene blue. This study presents important innovations associated to the surgical management of mammary neoplasms in bitches, demonstrating the effectiveness of the lymph node marking with 1% methylene blue, especially when administered intradermally, as well as emphasizing the importance of the medial pelvic lymphadenectomy in bitches with this condition. In view of the results obtained, it is indicated that the lymphadenectomy of the medial iliac lymph nodes of mammary chain involved with the neoplasia is part of the treatment of canines with mammary neoplasms, if they will be submitted to celiotomy for ovariohysterectomy or by another indication, regardless of size, location and presentation of these lymph nodes.

**Key words:** Metastasis. Sentinel lymph node. Lymphatic markers. Mastectomy. Canine.

## LISTA DE FIGURAS

### 1 MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 1 - Imagens da marcação linfática intrauterina em um canino fêmea, sete anos e 13,4 kg. (A) Exposição de corpo uterino para introdução de agulha de insulina acoplada em seringa de 1ml para administração intraparenquimatosa de azul de metileno a 1%. (B) Marcação uterina com azul de metileno a 1% após administração intrauterina intraparenquimatosa..... 19
- Figura 2 - Imagens da marcação linfática após administração intrauterina de azul de metileno a 1%, em um canino fêmea, nove anos e neoplasma ulcerado em M5 direita. (A) Neoplasma ulcerado em M5 direita. (B) Marcação uterina com azul de metileno a 1% após administração intrauterina intraparenquimatosa em canino com cisto para-uterino. (C e D) Evidente marcação linfática com azul de metileno a 1% em canino com linfonodo infartado.....20
- Figura 3 - (A) Visualização do linfonodo ilíaco medial esquerdo (seta preta), localizado lateralmente ao ureter (seta branca), após marcação intradérmica e impregnação com azul de metileno a 1% em canino com neoplasma em M5 esquerda. (B) Dissecção com pinça Crile curva em linfonodo com evidente marcação com azul de metileno a.....21
- Figura 4 - Visualização do linfonodo ilíaco medial direito, localizado lateralmente ao ureter, após marcação intradérmica e impregnação com azul de metileno a 1% em canino com neoplasma em M4 direita. (A e B) Evidente marcação linfática com azul de metileno a 1% em canino com linfonodo infartado, antes (A) e após a dissecção (B).....21
- Figura 5 - (A) Visualização dos vasos linfáticos corados com azul de metileno a 1% administrado pela via intradérmica, em canino com neoplasma em M4 direita. (B) Linfonodo marcado em azul, após a linfadenectomia.....22
- Figura 6 - Após o término do procedimento cirúrgico, efetuou-se bloqueio local infiltrativo ao redor de toda ferida operatória com bupivacaína ( $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )..23



## **2 ARTIGO 1 – ILIAC LYMPHADENECTOMY FOLLOWING INTRAUTERINE MAPPING IN A FEMALE DOG WITH BREAST NEOPLASM**

Figure 1 - Images of intrauterine lymphatic mapping and lymphadenectomy (medial iliac) of a 7-year-old, 13.4 kg, female canine. A- Exposure of uterine body for insertion of insulin needle coupled in a 1 ml syringe for intraparenchymal administration of 1% methylene blue. B- Uterine mapping with 1% methylene blue after intraparenchymal intrauterine administration. C- Visualization of the medial iliac lymph node (arrow), located laterally to the ureter and descending colon, after staining with 1% methylene blue. D- Clear lymphatic mapping with 1% methylene blue of the non-infarcted medial iliac lymph node (arrow) after dissection.....33

## **3 ARTIGO 2 – IMPORTANCE OF MEDIAL ILIAC LYMPH NODE REMOVAL IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY GLAND TUMORS**

Figure 1 - Visualization of medial iliac lymph nodes next to the ureter after staining and impregnation with 1% methylene blue (MB) in different patients and at different sites. (A and B). Evident lymphatic staining with intrauterine injection of 1% MB in a dog with enlarged lymph node. (C and D) Lymph node of normal size visualized after intradermal injection of 1% MB.....51

Figure 2 - (A) Exposure of the uterine corpus for insertion of insulin needle coupled to a 1-mL syringe for intraparenchymal administration of 1% MB. (B) Uterine staining and impregnation of lymphatic vessels with 1% MB after intrauterine, intraparenchymatous injection.....52

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1	REFERENCIAL TEÓRICO .....	12
1.2	PROPOSIÇÃO .....	16
1.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1.3.1	Animais e procedimentos peri operatórios.....	17
1.3.2	Procedimento cirúrgico .....	17
1.3.3	Procedimentos pós-operatórios .....	22
<b>2</b>	<b>ARTIGO 1 – ILIAC LYMPHADENECTOMY FOLLOWING INTRAUTERINE MAPPING IN A FEMALE DOG WITH BREAST NEOPLASM.....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO 2 – IMPORTANCE OF MEDIAL ILIAC LYMPH NODE REMOVAL IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY GLAND TUMORS.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Esta tese demonstrará na forma de dois artigos os resultados obtidos a partir de uma pesquisa sobre a eficácia da técnica de marcação linfática para o linfonodo ilíaco medial em cadelas com neoplasma mamário, utilizando o corante azul de metileno em diferentes locais de administração (intrauterino e intradérmico) e determinar se existe o acometimento nesse tecido linfático, permitindo assim estabelecer se a linfadenectomia dos ilíacos mediais é importante em pacientes com neoplasma mamário, a partir da comprovação da ocorrência de metástases nos referidos linfonodos.

Para sua confecção, foi utilizado o manual de dissertações e teses da Universidade Federal de Santa Maria 2015.

No final da tese encontra-se o item DISCUSSÃO, o qual estabelece uma conexão entre os artigos apresentados integrando e discutindo a temática e os resultados dos artigos como um todo. As REFERÊNCIAS reportam o conteúdo bibliográfico utilizado para confeccionar os itens REFERENCIAL TEÓRICO e DISCUSSÃO.

Os artigos estão estruturados conforme as normas das revistas para as quais foram submetidos ou publicados. Portanto, o ARTIGO 1 encontra-se de acordo com as normas da Acta Scientiae Veterinariae, enquanto o ARTIGO 2, está descrito conforme as normas da revista Veterinary Surgery.

O presente projeto foi desenvolvido no Bloco 5 do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria, com auxílio da equipe SOMIV (Soluções Minimamente Invasivas Veterinárias), sob coordenação do professor Maurício Veloso Brun.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

A grande maioria das cadelas possui cinco pares de glândulas mamárias, dispostas em duas fileiras bilaterais simétricas que se prolongam da região ventral do tórax a região inguinal. Porém, a formação da glândula mamária nem sempre é simétrica e a quantidade de mamas pode variar de oito a 12, sendo denominados conforme sua localização em torácica cranial (M1), torácica caudal (M2), abdominal cranial (M3), abdominal caudal (M4) e inguinal (M5) (REESE et al., 2016).

Quanto a irrigação sanguínea das mamas torácicas, essa 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 (BRAGULLA et al., 1999).

Em pacientes sadios, a linfa proveniente das mamas torácicas craniais não apenas drena para o linfonodo axilar, como também para o linfonodo cervical superficial. Já a oriunda das mamas abdominais craniais pode drenar tanto para o linfonodo axilar quanto para o linfonodo inguinal superficial, enquanto a linfa das mamas abdominais caudais e inguinais pode drenar para os linfonodos ilíacos mediais. Relataram-se ocorrências de interconexão dos linfonodos inguinais superficiais esquerdo e direito (HORST et al., 2016).

Dentre as neoplasias em cadelas, as da glândula mamária são as mais frequentes, representando cerca de 50 a 70% das afecções dessa natureza. Estima-se que no Brasil a incidência de tumores malignos seja superior a 70%, maior do que nos EUA, cuja incidência é de 50%, possivelmente pela prática comum da realização de ovariectomia (OVH) em cadelas jovens (De NARDI, 2016).

A maioria das neoplasias mamárias é maligna e, em 25% dos casos, os animais apresentam metástases em linfonodos regionais no momento do diagnóstico e, por vezes, no parênquima pulmonar. Embora não visíveis por meio de exame radiográfico simples, as micrometástases podem estar presentes em muitos casos (De NARDI, 2016). Segundo estudo de Oliveira (2010), cães idosos tiveram mais neoplasmas malignos (79,9%) que os adultos (67,8%), sendo maior a média de idade dos cães com neoplasmas malignos (9,5 anos) quando comparada aos que apresentam neoplasmas benignos (8,5 anos).

Comumente os neoplasmas mamários em caninos se apresentam como nódulos circunscritos, com tamanho, consistência e mobilidade variável, que podem estar associados a ulceração cutânea e a reações inflamatórias locais (CASSALI et al., 2014). Diferentes tumores, com tipos histológicos distintos, podem envolver simultaneamente múltiplas glândulas mamárias, sendo o neoplasma de pior prognóstico o que determinará a evolução clínica do paciente (CAVALCANTI et al., 2006; KURZMAN et al., 1983).

As mamas inguinais são a localização da maioria dos neoplasmas mamários. Queiroga & Lopes (2002) citam que esta condição decorre possivelmente da maior quantidade de parênquima nessas mamas. Contudo, outra explicação considera que possivelmente há maior abundância de receptores hormonais nessas mamas, favorecendo assim a ocorrência de neoplasmas (DONNAY et al., 1995).

O sistema linfático representa importante papel no controle local dos neoplasmas e também no transporte de células tumorais, o qual, torna-se a via mais comum de metástases em neoplasias. Sabe-se que cada linfonodo recebe drenagem de regiões específicas do corpo e responde de maneira particular a cada tipo de doença (câncer, infecções por microrganismos, doenças auto-imunes) (COWELL et al., 2003).

De acordo com Pereira (2003), a partir do crescimento de algumas neoplasias, período esse conhecido como tumorigênese, há o aparecimento de fatores prolinfangiogênicos que induzem a formação de novos vasos linfáticos e ampliam a rede de drenagem tumoral para os linfonodos alvos e regionais. Muitas das alterações linfáticas peritumorais são determinadas pela expressão do fator VEGF-c pelas células tumorais, o que resulta no estabelecimento de novos sítios de drenagem. Devido a isso, torna-se possível a presença de células metastáticas em linfonodos distantes da neoplasia primária (BESERRA et al., 2016).

Recidivas e metástases são esperadas na maioria dos neoplasmas mamários malignos, observando-se com maior frequência, em linfonodos regionais (axilares e inguinais) e em localizações distantes como outros linfonodos, pulmões, coração, baço, adrenais e encéfalo (MISDORP et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2010). De acordo com estudo de Oliveira (2010), metástases para linfonodos foram observadas na necropsia de 39 (29,5%) cadelas com tumor maligno, onde apenas um linfonodo foi acometido em 33,3% dos casos e mais de um linfonodo acometido em 66,7% dos casos.

Os primeiros linfonodos de um linfocentro regional a drenar a linfa do sítio neoplásico são denominados de linfonodos sentinela, portanto, os primeiros a conter as células tumorais, revelando com sua biopsia o *status* nodal. A presente técnica baseia-se no princípio de drenagem em *progressão escalonada*, concebido por Veronesi (1997), que estabelece que a linfa não permeia todos os linfonodos de um linfocentro ao mesmo tempo, mas sim escalonadamente (BESERRA et al., 2013; BESERRA et al., 2016).

Destaca-se que a compreensão do fluxo linfático torna-se clinicamente importante no que se refere a metástases no caso de tumores mamários, uma vez que a condição dos linfonodos no exame clínico-patológico é um importante fator prognóstico, pois o tempo de sobrevida é inferior a dois anos para 85,7% dos cães com metástases para linfonodos (KARAYANNOPOULOU et al., 2005).

Embora diversos estudos citam o sistema linfático mamário de caninos, o mesmo é pouco estudado quanto ao padrão de comunicação entre as cadeias linfáticas mamárias, tanto em animais sadios ou com neoplasmas na referida glândula. Souza (2016), estudou a técnica de linfadenectomia inguinoilíaca intrabdominal em animais sadios, realizando a marcação linfática intradérmica ao redor da glândula mamária inguinal com azul de metileno e verde de indocianina, não obtendo êxito na coleta de linfonodos com a metodologia empregada.

A relação entre os linfonodos ilíacos mediais e a drenagem dos cornos e corpo uterino foi avaliado em estudo de Justino (2014), o qual teve por objetivo contribuir com o diagnóstico precoce e distúrbios de afecções uterinas. Frente a isso, utilizou-se o corante azul patente V como marcador linfático, aplicando-se esse no corpo uterino de cadelas. Dessa forma, pôde-se observar que a cadeia de linfonodos ilíacos recebe grande parte da drenagem dos cornos uterinos.

Diversos são os métodos de identificação dos linfonodos sentinela, como o uso de corantes vitais, radiofármacos ou da utilização de ambos simultaneamente. Dos corantes, os mais utilizados para identificação do linfonodo sentinela são o azul isossulfan (mais usado na Europa) e azul patente (mais usado no Brasil e nos Estados Unidos) e em uma menor frequência o azul de metileno (BRENET et al., 2013). Porém, outros marcadores já foram utilizados em cadelas, como a hemossiderina (PINHEIRO, 2009), tecnécio (PINHEIRO et al., 2003), o iopamidol (SUGA et al., 2007), a fluoresceína (WELLS et al., 2006) e, em humanos, o verde de indocianina (MIYASHIRO et al., 2010).

O azul de metileno pertence à classe das fenotiazinas, orgânico e aromático. Pode ser utilizado em cães, com excelentes resultados na identificação dos linfonodos, com a vantagem em relação aos outros corantes, de fácil obtenção e baixo custo. Relatam-se reações de hipersensibilidade a seu uso em caninos, como a apresentação de paniculite e pigmentação da região de inoculação e de outros tecidos, recomendando-se a utilização de 1 a 2 ml de contraste por animal (PATSIKAS, 2006; JEUDY, 2008; PINHEIRO, 2009; SUAMY, 2012; SUAMY, 2013; BESERRA, 2016; MARANHÃO, 2016).

Segundo estudos de Tripathy (2012) e Parvaiz (2012) em humanos, pode-se classificar os graus de gravidade relacionados a reações de hipersensibilidade ao azul patente em grau I (69%-87%) - caracterizado por urticária de cor azulada, prurido e erupções cutâneas generalizadas; grau II (3,2%-8%) hipotensão (pressão arterial sistólica < 70 mmHg) sem necessidade do uso de vasopressor e ausência de broncoespasmo e laringoespasmo; e grau III (1,1%) caracterizado por colapso cardiovascular severo que necessita de vasopressor com suspensão do procedimento cirúrgico e traslado do paciente para unidade de terapia intensiva.

Após a administração intradérmica ou intraparenquimatosa de azul, o mesmo é captado por vasos linfáticos da área de drenagem, liga-se à albumina e 2/3 são absorvidos na primeira hora e completamente em 24 horas, sendo excretado pela urina e bile. O paciente pode apresentar urina de coloração azul por até 24 horas (SHINZATO et al., 2006; TRIPATI et al., 2012).

Várias são as técnicas de marcação dos linfonodos sentinela (WONG et al., 1991; SOUZA et al., 2013; JUSTINO et al., 2014; SUAMI et al., 2016). A mais amplamente utilizada em neoplasmas mamários de caninos é a de inoculação de corantes vitais ou radiomarcadores intratumorais ou peritumorais, sendo que a inoculação perineoplásica tem demonstrado bons resultados, com maior rapidez na drenagem do contraste (BESERRA et al., 2016).

O procedimento que confere maior probabilidade de cura dos neoplasmas mamários é a remoção cirúrgica completa das neoplasias localizadas, sem envolvimento metastático, além da ressecção tumoral também permitir análise histopatológica, aumentar a sobrevida do paciente, proporcionar qualidade de vida e, com exceção do carcinoma inflamatório ou da presença de metástases a distância, poder ser curativa (MARTINS et al., 2003; CHANG et al., 2005; LANA et al., 2007;

STRATMANN et al., 2008; SORENMO et al., 2011; FELICIANO et al., 2012; CASSALI et al., 2014; De NARDI, 2016).

Para a mastectomia, torna-se necessário o conhecimento da drenagem linfática das glândulas mamárias, uma vez que os linfonodos axilares, os inguinais superficiais, os sublombares e o esternais craniais estão envolvidos. Porém, a drenagem linfática nos tumores mamários é complexa e embora possa ocorrer entre todas as glândulas, a maioria das conexões são entre as mamas torácicas craniais e caudais e entre as mamas abdominais caudais e as inguinais (De NARDI, 2016).

Na medicina, a linfadenectomia é uma técnica que vem sendo utilizada com frequência, principalmente em pacientes com neoplasias malignas, nos quais os tumores são grandes e existe o envolvimento do linfonodo alvo (LAVERY et al., 2010). Para o câncer de próstata em humanos, a linfadenectomia pélvica é considerada o procedimento de estadiamento mais exato, sugerindo em alguns trabalhos a possibilidade terapêutica dessa técnica, porém ainda com dados inconsistentes. Entretanto, sabe-se que existe forte associação entre o estado linfonodal e a ocorrência de metástases à distância, sendo, conseqüentemente o comprometimento linfonodal um importante indicador do potencial metastático no câncer (BRANCO & KONDO, 2007; CASTELO et al., 2010; WAINSTEIN et al., 2015).

Em medicina veterinária, Souza (2013; 2016) mostrou que a técnica de linfadenectomia abdominal em cadelas é viável pelo acesso laparoscópico, após a aplicação intradérmica do azul de metileno estéril, ao redor de M5 de um canino com neoplasmas mamários entre M4-M5, buscando-se demarcação dos vasos linfáticos e linfonodos regionais. O estudo de Lim (2017) teve o objetivo de descrever a técnica laparoscópica para linfadenectomia bilateral dos íliacos mediais em caninos machos hígdos, e mostrou que essa técnica é adequada e possibilita a obtenção de boas amostras para encaminhamento histopatológico, associado a pouco tempo operatório.

## 1.2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse trabalho foi verificar a eficácia da técnica de marcação linfática para a cadeia de linfonodos íliacos mediais em cadelas com neoplasma mamário, utilizando o corante azul de metileno e diferentes locais de administração (intrauterino e ao redor da glândula mamária inguinal), estabelecer quanto à



ocorrência de metástases nos referidos linfonodos, bem como quanto a importância da linfadenectomia em animais acometidos por neoplasmas mamários.

Quanto aos objetivos específicos da pesquisa científica, procurou-se realizar a contagem, por meio do exame histopatológico, do número de linfonodos extirpados, verificando a qualidade de impregnação e a quantidade de linfonodos marcados. Também verificou-se qual técnica de injeção do contraste (intrauterino ou intradérmico) apresenta melhores resultados para a marcação da rede linfática ilíaca, além da existência, ou não, de células tumorais em linfonodos ilíacos mediais de cadelas com neoplasma mamário.

### 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

A descrição que segue envolve a metodologia empregada nos pacientes referentes aos Artigos 1 e 2.

#### 1.3.1 Animais e procedimentos peri-operatórios

Os animais foram selecionados na cidade de Santa Maria e arredores, as quais os tutores tiveram interesse em realizar a esterilização cirúrgica e a mastectomia, contribuindo assim com a comunidade a partir da realização desta necessária intervenção a baixos custos ou sem custos. O experimento foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos pela Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM, sob parecer número 043/2013.

Foram incluídos no estudo animais cujo tutor/responsável autorizou, por escrito, a inclusão no protocolo experimental, ciente dos riscos e implicações, após ampla explanação da metodologia a ser empregada, riscos e benefícios dos procedimentos associados. Podemos citar como critérios de exclusão utilizados para a seleção dos pacientes, a presença de qualquer doença comcomitante (doença uterina/ovariana; alterações hematológicas graves), presença de metástases a distância e peso corporal superior a 15Kg.

Os animais foram internados no dia anterior ao procedimento cirúrgico, permanecendo em gaiolas individuais e a alimentação fornecida durante o período foi ração comercial e água *ad libitum*.

Ao todo, foram selecionadas 38 cadelas, com peso médio de  $10,7 \pm 4,2$  Kg, de  $9,9 \pm 2,5$  anos, com neoplasmas mamários em diferentes mamas, estando esses ulcerados ou não. As cadelas foram distribuídas em dois grupos (GI e GU). No GU (17 animais), realizou-se marcação linfática com corante administrado via intrauterina, seguido da linfadenectomia do íliaco medial ipsilateral ao neoplasma, OVH e mastectomia radical unilateral. No GI (21 animais), realizou-se a OVH seguida da marcação linfática com corante administrado via intradérmica (ao redor de M5) e subsequente linfadenectomia do íliaco medial e posterior mastectomia total unilateral. Em todos os animais utilizou-se como corante o azul de metileno 1%.

Anteriormente ao procedimento cirúrgico, os pacientes foram submetidos a avaliação clínica, laboratorial e a exames de imagem. Os exames pré-cirúrgicos incluíram interpretação de hemograma e testes bioquímicos para avaliação da creatinina, da uréia, da albumina, da alanina-amino-transferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA). Também foram realizadas a pesquisa de metástases dos pacientes com neoplasma, por meio de radiografias torácicas em três incidências e ecografia abdominal. Todos os animais receberam Ringer lactato como solução hidroeletrólítica de manutenção no transoperatório ( $5 \text{ ml.Kg.h}^{-1}$ , i.v.).

Foi instituído jejum sólido de oito horas e hídrico de quatro horas. Como medicação pré-anestésica (MPA) foi administrado metadona ( $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.m.). Passados 15 minutos da MPA, realizou-se ampla tricotomia abdominal. Os animais foram induzidos com propofol em dose suficiente para intubação endotraqueal e mantidos na anestesia geral inalatória com isoflurano vaporizado em  $\text{O}_2$  a 100%. A administração de ampicilina sódica ( $20 \text{ mg.kg}^{-1}$ , i.v.) como profilaxia antimicrobiana foi realizada 30 minutos antes do início do procedimento cirúrgico e repetida a cada 90 minutos, até o término da cirurgia. Nos animais que apresentaram sinais de dor no transoperatório, foi realizado resgate analgésico com citrato de fentanila ( $2,5 \mu\text{g/kg}^{-1}$ , i.v.).

### **1.3.2 Procedimento cirúrgico**

Todas as cirurgias foram executadas pelo mesmo cirurgião proficiente em todos os procedimentos propostos. A técnica cirúrgica da linfadenectomia dos íliacos mediais variou conforme a localização do neoplasma (esquerda ou direita).

Todos os pacientes foram colocados em decúbito dorsal e submetidos a sondagem uretral (sonda uretral 10Fr) para esvaziamento vesical, sendo essa mantida no transoperatório. A antisepsia prévia do campo operatório foi efetivada com clorexidine degermante 2%, seguido da aplicação de clorexidine alcoólico 0,5%. As anestésias foram realizadas sempre pelo mesmo profissional, com proficiência para anestésias de pacientes ASA 3.

As cadelas foram distribuídas em dois grupos (GI e GU) de forma aleatória (sorteio). No GU (17 animais), após celiotomia retro umbilical e exposição do corpo uterino, realizou-se marcação linfática com azul de metileno 1% (Figura 1), administrado via intrauterina (intramural no corpo do útero), seguida da linfadenectomia do íliaco medial, OVH e mastectomia unilateral. No GI (21 animais), realizou-se inicialmente a OVH por meio de celiotomia retro umbilical, seguida da marcação linfática com azul de metileno 1%, administrado via intradérmica (ao redor de M5) e subsequente linfadenectomia do íliaco medial, celiorrafia e posterior mastectomia unilateral.

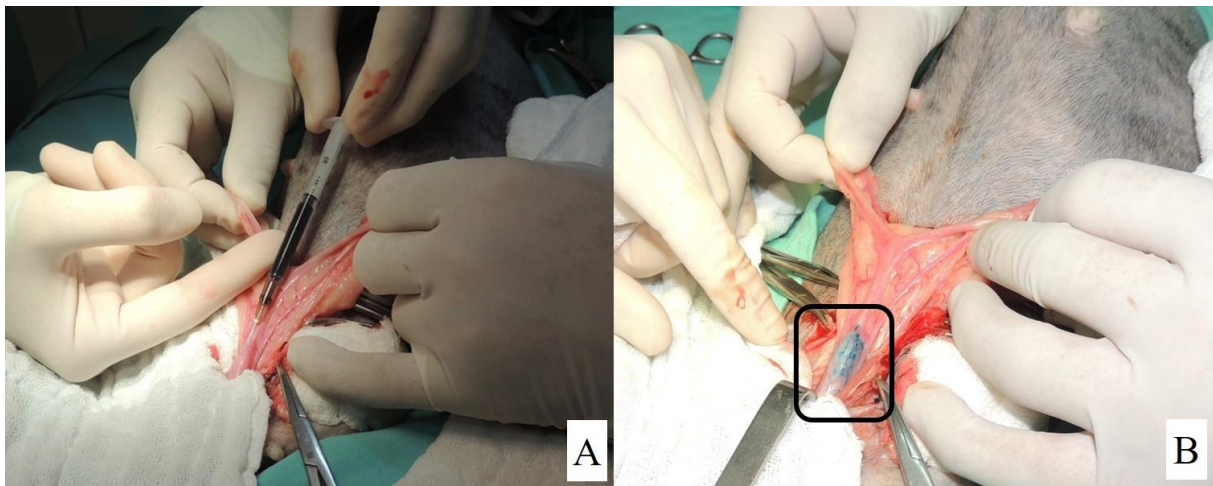


Figura 1 – Marcação linfática intrauterina em um canino fêmea, de sete anos e 13,4 kg. (A) Exposição de corpo uterino para introdução de agulha de insulina acoplada em seringa de 1ml para administração intramural de azul de metileno a 1%. (B) Marcação uterina com azul de metileno a 1% após administração intrauterina intramural.

Em todos os animais utilizou-se 0,5ml de azul de metileno 1%. A linfadenectomia (esquerda ou direita) variou, na dependência do acometimento da cadeia mamária. Nos animais que apresentaram neoplasma em cadeia mamária direita, realizou-se a linfadenectomia do íliaco direito e, por conseguinte, nos animais

que apresentaram neoplasma em cadeia mamária esquerda, no linfonodo íliaco medial contralateral.

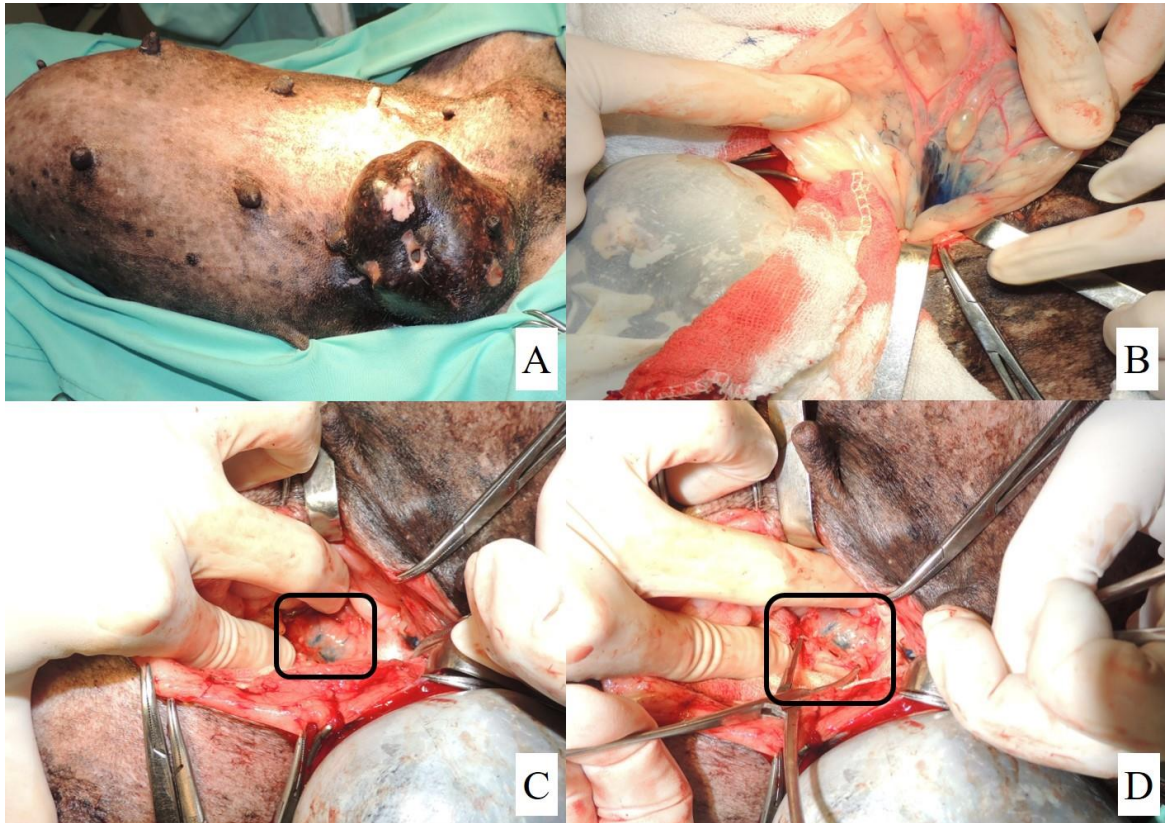


Figura 2 – Imagens da marcação linfática após administração intrauterina de azul de metileno a 1%, em um canino fêmea, nove anos com neoplasma ulcerado em M5 direita. (A) Neoplasma ulcerado em M5 direita. (B) Marcação uterina com azul de metileno a 1% após administração intrauterina intramural em canino com cisto para-uterino. (C e D). Evidente marcação linfática com azul de metileno a 1% em canino com linfonodo íliaco medial infartado.

Logo após a administração do azul de metileno, em ambos os grupos, localizou-se o linfonodo íliaco medial corado em azul ou não (Figura 2 e 5), rebatendo o cólon descendente lateralmente e, ao lado do ureter, abaixo do tecido adiposo retroperitoneal, na altura da bifurcação da artéria íliaca, dissecou-se o linfonodo com auxílio de gaze e de pinça hemostática Crile curva (Figura 3 e 4).

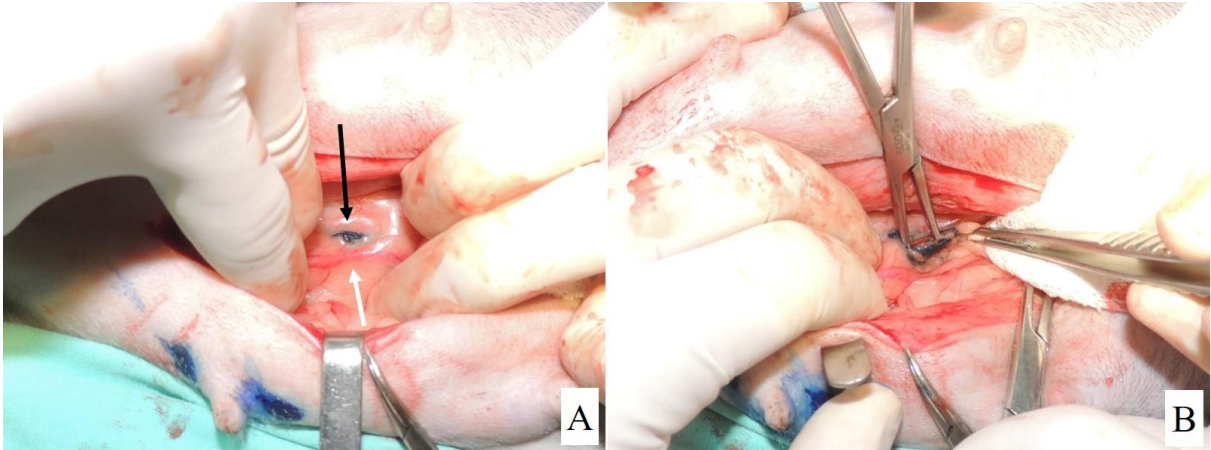


Figura 3 – (A) Visualização do linfonodo íliaco medial esquerdo (seta preta), localizado lateralmente ao ureter (seta branca), após marcação intradérmica e impregnação com azul de metileno a 1% em canino com neoplasma em M5 esquerda. (B) Dissecação com pinça Crile curva em linfonodo com evidente marcação com azul de metileno a 1%.

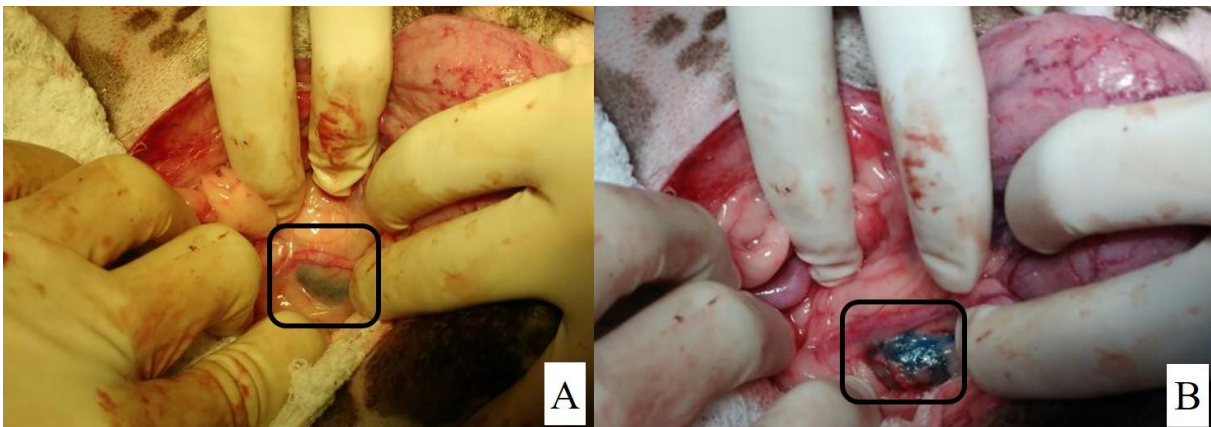


Figura 4 – Visualização do linfonodo íliaco medial direito, localizado lateralmente ao ureter, após marcação intradérmica e impregnação com azul de metileno a 1% em canino com neoplasma em M4 direita. (A e B). Evidente marcação linfática com azul de metileno a 1% em canino com linfonodo infartado, antes (A) e após a dissecação (B).

Todos os tecidos extirpados (ovário, cornos e corpo uterino; linfonodo íliaco medial; cadeia mamária) foram coletados e enviados logo após o procedimento cirúrgico para análise histopatológica e realização da correlação entre os resultados histológicos dos linfonodos intracavitários (caso algum destes apresentasse células tumorais) com os histopatológicos dos neoplasmas das glândulas mamárias e linfonodos regionais extracavitários.

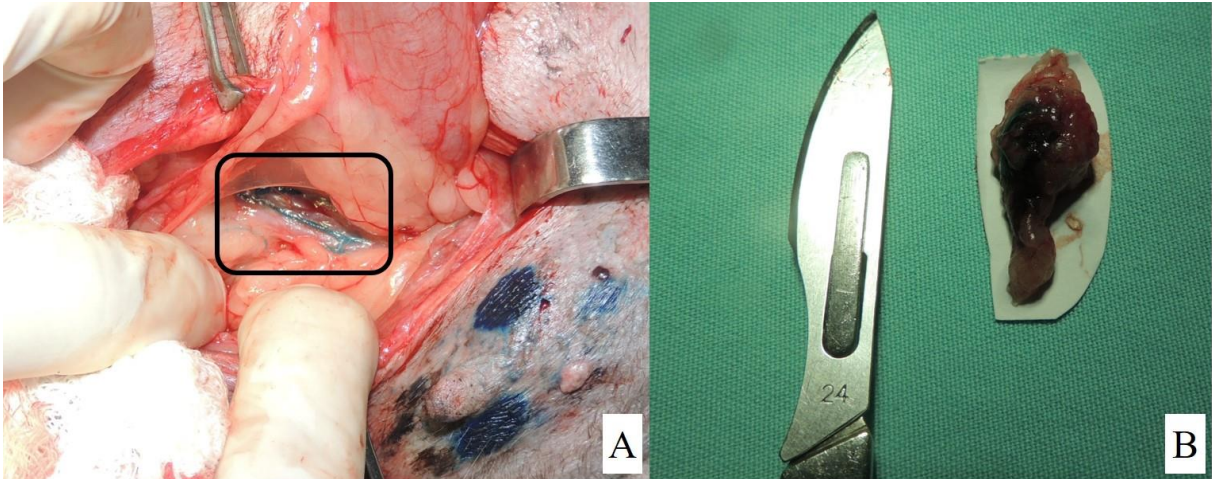


Figura 5 – (A) Visualização dos vasos linfáticos corados com azul de metileno a 1% administrado pela via intradérmica, em canino com neoplasma em M4 direita. (B) Linfonodo marcado em azul, após a linfadenectomia.

### 1.3.3 Procedimentos pós-operatórios

Para analgesia pós-operatória, ao término da cirurgia foi efetuado bloqueio local infiltrativo (Figura 6) ao redor de toda ferida operatória com bupivacaína ( $4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Realizou-se curativo (com compressa estéril e atadura), o qual foi indicado aos tutores, que permanecesse por três dias pós-operatório. Todos os animais receberam terapia anti-inflamatória com meloxicam ( $0,1\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , v.o., s.i.d.) por quatro dias, dipirona ( $25\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , v.o., t.i.d.) por três dias e tramadol ( $5\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ , v.o., q.i.d.) por quatro dias. Em alguns casos a prescrição foi modificada, dependendo o caso clínico e o procedimento efetuado. Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais permaneceram em observação, recebendo fluidoterapia até a plena recuperação anestésica, em gaiolas individuais em ambiente climatizado.



Figura 6 – Canino, fêmea, 10 anos de idade. Após o término do procedimento cirúrgico, em todos os paciente, efetuou-se bloqueio local infiltrativo ao redor de toda ferida operatória com bupivacaína ( $4\text{mg.kg}^{-1}$ ).

Após a coleta de útero e ovários, linfonodos (ilíacos mediais) e cadeia mamária, estas foram encaminhadas para a realização do exame histopatológico, a fim de verificar se houve a impregnação de corante em algum dos linfonodos, bem como se existe a presença de células neoplásicas, sendo também realizada a contagem do número de linfonodos encontrados.

**2 ARTIGO 1 – ILIAC LYMPHADENECTOMY FOLLOWING INTRAUTERINE  
MAPPING IN A FEMALE DOG WITH BREAST NEOPLASM**

**Artigo publicado no periódico:**

Acta Scientiae Veterinariae

**Acta Scientiae Veterinariae, 2018. 46 (Suppl 1): 273.**



## Iliac Lymphadenectomy Following Intrauterine Mapping in a Female Dog with Breast Neoplasm

**João Pedro Scussel Feranti<sup>1,2</sup>, Gabriela Pesamosca Coradini<sup>2</sup>, Marcella Teixeira Linhares<sup>2</sup>,  
Hellen Fialho Hartmann<sup>2</sup>, Rammy Vargas Campos<sup>2</sup>, Marília Teresa de Oliveira<sup>3</sup>, Rafael  
Oliveira Chaves<sup>2</sup>, Álvaro José Chávez Silva<sup>2,4</sup> & Maurício Veloso Brun<sup>5</sup>**

<sup>1</sup> Surgery and Veterinary Clinic Department, University of the Campanha Region (URCAMP), Alegrete, RS, Brazil. <sup>2</sup> Graduate Program of Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS. <sup>3</sup> Veterinary Clinics Department, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS. <sup>4</sup> Animal Welfare Department, National Autonomous University of Nicaragua (UNAN), Leon, Nicaragua. <sup>5</sup> PPPGMV, UFSM, Santa Maria. CORRESPONDENCE: M.V. Brun [mauriciovelosobrun@hotmail.com - Tel.: +55 (54) 99962-7707]. Av. Roraima n. 1000, Cidade Universitária. Bairro Camobi. CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Researcher of CNPq - Brazil (308019/2015-6; 200346/2017-2).

### ABSTRACT

**Background:** The lymphatic system plays an important role in the local control of neoplasms as well as in the transportation of tumor cells, which represents the most common pathway of metastasis. From the tumorigenesis, there is a remarkable enlargement of the tumor drainage network towards the regional and target lymph nodes. Since the mammary lymphatic system of animals with neoplasms as well as the demarcation of the pelvic and abdominal caudal chain are poorly studied, the aim of the present study is to report a case of iliac lymphadenectomy after intrauterine lymphatic dyeing in a dog with breast neoplasm, which allowed the identification of metastasis in the medial iliac lymph node.

**Case:** A seven-year-old, 13.4 kg, non – neutered, mixed – breed, female dog was diagnosed with ulcerative neoplasm in the left caudal abdominal breast, which presented evolution of approximately 90 days, presenting ulceration for 10 days, according to the tutor. After a clinical evaluation, thoracic radiography and abdominal ultrasonography were requested, which did not present metastasis suggestive images. Therefore, left unilateral total mastectomy was indicated. Retro-umbilical celiotomy was performed for the administration of 0.5mL of 1% intrauterine methylene blue (body of the uterus), which allowed lymphatic mapping and medial iliac lymphadenectomy. Subsequently, ovariectomy was performed and after celiorrhaphy, axillary lymphadenectomy was performed, followed by left unilateral mastectomy and concomitant removal of the superficial inguinal lymph node. The patient had a prompt recovery and was discharged from hospital in six hours postoperatively. The excised material was referred for histopathological examination, which revealed the presence of metastasis of simple tubulopapillary carcinoma of the mammary gland in the left iliac medial and superficial inguinal lymph nodes, while the axillary lymph node had no metastases. At the end of 10 days, the patient was clinically stable, with good healing of the surgical wound. After a 120-day postoperative period, the patient had a good clinical status, with no respiratory alterations, and there was no evidence of metastasis on the chest X-ray as well as abdominal ultrasound.

**Discussion:** Considering the great occurrence of breast neoplasms, it is important to develop studies on new approaches in the therapeutic management of this condition and sharing of reports as described. The objective of the lymphadenectomy was to evaluate the possible involvement of regional lymph nodes, since, according to the condition of the lymph nodes in the histopathological examination, it appears as an important prognostic factor, seeing that the survival time is less than two years for 85.7% in dogs with regional lymph node metastases. In animals, there are no studies based on the therapeutic alternative of lymphadenectomy, which is believed to be palliative in the reported patient, due to the fact that it is a tubulopapillary carcinoma with different foci of lymph node metastases. Otherwise, lymphadenectomy enabled a better definition of the prognosis and proved to be an important tool for staging. The use of methylene blue was chosen because it was reportedly used in dogs, with excellent results in sentinel lymph nodes mapping, and due to its ease of obtaining and low cost of application. It is concluded that in canines with breast neoplasms, it is important to perform lymphatic mapping to identify possible metastases in cellular tissues and to delimit regional lymph vessels and lymph nodes, thus facilitating the surgical removal of these structures with safety margins. In addition, it is important to perform lymphadenectomy even to lymph nodes that are not infarcted or present macroscopic changes, given that in this case, it already existed metastasis, even in a lymph node of 4 mm.

**Keywords:** metastasis, sentinel lymph node, lymphatic mapping, mastectomy, canine.

## INTRODUCTION

Among the neoplasias in female dogs, those of the mammary gland are the most frequent, representing about 50 to 70% of the affections of this nature. It is estimated that in Brazil the incidence of malignant tumors exceeds 70%, which may result in the appearance of regional lymph node metastases at the time of diagnosis and sometimes in the pulmonary parenchyma [6].

The lymphatic system plays an important role in the local control of neoplasms and in the transportation of tumor cells, which represents the most common pathway of metastases [5]. From the tumorigenesis, appears lymphangiogenic factors that induce the formation of new lymphatic vessels and enlarge the tumor drainage network to the regional, and target lymph nodes, which makes possible the presence of metastatic cells in lymph nodes distant from the primary neoplasia [13]. Thus, lymphatic mapping with vital dyes becomes an alternative for the identification of sentinel lymph nodes [1].

The mammary lymphatic system of animals with neoplasms has been poorly studied. Also, the demarcation of the pelvic and abdominal caudal chain is not routinely used for identification and removal of microlinphonodes during celiotomies. Due to the above mentioned, the aim of this study is to report a case of iliac lymphadenectomy after intrauterine lymphatic dyeing in a female dog with breast neoplasm, which allowed the identification of metastasis in the medial iliac lymph node.

### CASE

A seven-year-old, 13.4 kg, non-neutered, mixed – breed, female dog was diagnosed with ulcerative neoplasm in the left caudal abdominal breast, which presented evolution of approximately 90 days, presenting ulceration for 10 days, according to the tutor. After a clinical evaluation, thoracic radiography and abdominal ultrasonography were requested, which did not present images suggestive of metastasis. Hematological exams for evaluation of the renal and hepatic function, as well as erythrogram and leukogram analysis, were within the reference parameters for the species. Therefore, left unilateral total mastectomy was indicated.

After extensive trichotomy of the operative area and establishment of an adequate anesthetic plane, retro-umbilical celiotomy was performed for the administration of 0.5mL of 1% intrauterine methylene blue (body of the uterus); with the aid of an insulin needle coupled in a 1ml syringe (Figures 1A and 1B). This allowed lymphatic staining and lymphadenectomy of the medial iliac lymph node (Figures 1C and 1D). Subsequently, ovariohysterectomy was performed and after celiorrhaphy, axillary lymphadenectomy was performed, followed by left unilateral mastectomy and concomitant removal of the superficial inguinal lymph node. The patient had a prompt recovery and was discharged from hospital in six hours postoperatively.

The excised material was referred for histopathological examination, which revealed metastasis of simple tubulopapillary carcinoma in the left medial iliac (4mm) and superficial

inguinal lymph node (1,2cm), while the axillary lymph node had no metastases. Upon examination of the mammary chain, it was possible to detect the preservation of margins of neoplasm-free tissue, despite the diagnosis of tubulopapillary carcinoma with presence of neoplastic cells within the lymphatic vessels.

From the results of the tests, chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide was indicated, but the owner chose not to perform chemotherapy. The patient still had ovarian and parauterine cyst, as well as cystic endometrial hyperplasia, confirmed by histopathological analysis.

At the end of 10 days, the patient was clinically stable, with good healing of the surgical wound. After a 120-day postoperative period, the patient had a good clinical status, with no respiratory alterations, and there was no evidence of metastasis on the chest X-ray as well as abdominal ultrasound.

## **DISCUSSION**

Considering the great occurrence of breast neoplasms, it is important to develop studies based on new approaches in the therapeutic management of this condition. As well as to share the findings through reports; such as the one described here in which iliac, axillary and inguinal lymphadenectomies were performed, associated with mastectomy and ovariohysterectomy, which had not previously been documented in small animals according to the literature.

The objective of the lymphadenectomy was to evaluate the possible involvement of regional lymph nodes, since, according to Karayannopoulou [9], the lymph node condition in histopathological examination is an important prognostic factor, given that the survival time is less than two years for 85,7% of dogs with regional lymph node metastases.

As for human prostate cancer, pelvic lymphadenectomy is considered the most accurate staging procedure, being suggested in some studies this therapeutic alternative, but still with inconsistent data [2,4,17]. In animals, there are no studies on the therapeutic feasibility of

lymphadenectomy, which is believed to be palliative in the reported patient, owing to the fact that it is a tubulopapillary carcinoma with different foci of lymph node metastases. Otherwise, lymphadenectomy enabled a better definition of the prognosis and proved to be an important tool for staging.

Identification of the iliac lymph node was possible due to intrauterine lymphatic mapping, according to the technique described by Justino et al. [8], who observed that the chain of iliac lymph nodes receives a substantial part of the drainage of the uterine horns. Differing from the work of Justino et al. [8], methylene blue was used as a lymphatic dye in this patient, which also allowed the successful localization and subsequent excision of the iliac lymph node.

There are several methods of sentinel lymph nodes mapping. Among the existing dyes, isosulfan blue (more used in Europe), patent blue (more used in Brazil and the United States), and at a lower frequency, methylene blue [3] are the most used. However, other markers have already been used in dogs, such as hemosiderin [15], technetium [14], iopamidol [16], fluorescein [18] and, in humans, indocyanine green [11]. The use of methylene blue was chosen because it has been used in dogs, with excellent results in the lymph nodes mapping, added to its ease of obtainment and low cost of application.

In spite of reports of hypersensitivity reactions with the use of methylene blue in canines, such as panniculitis and pigmentation of the inoculated region and other tissues, it is recommended to use 1 to 2 ml of contrast per animal [1,7,10,12,13]. Such alterations were not observed in the reported patient; and the dose used, although inferior to those described by some authors, allowed adequate dyeing.

Therefore, it is concluded that in canines with breast neoplasms, it is important to perform lymphatic mapping to identify possible metastases in cellular tissues and to delimit regional lymph vessels and lymph nodes, thus facilitating the surgical removal of these structures with safety margin. The report also shows that ovariohysterectomy and pelvic

lymphadenectomy may present considerable importance in the management of breast neoplasms in dogs. In addition, it is relevant to perform lymphadenectomy even for lymph nodes that are not infarcted or present macroscopic changes, since in this case there was already metastasis even in a lymph node of 4 mm.

#### MANUFACTURERS

<sup>1</sup> Methylene blue 1%®, Injectcenter, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

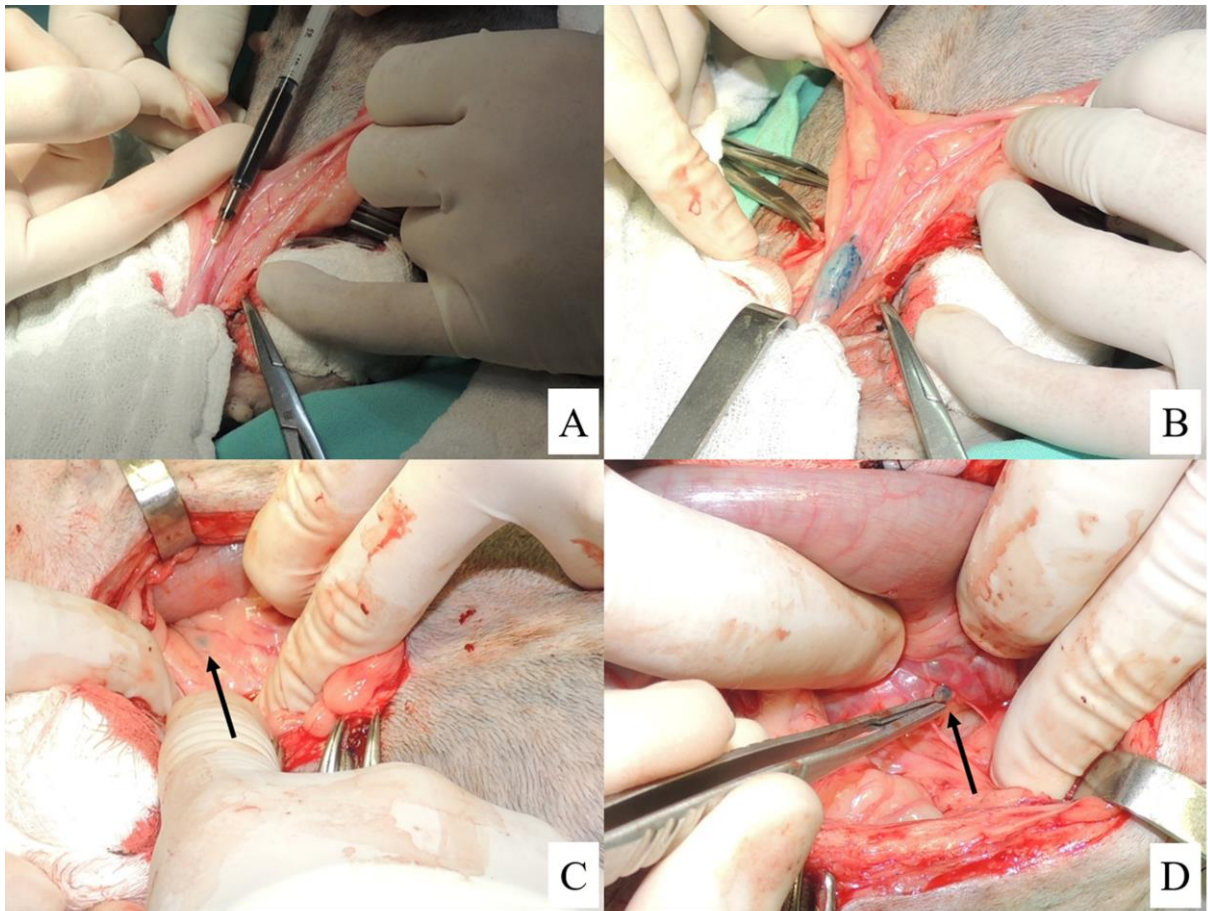
#### REFERENCES

- 1 **Beserra H.E. 2016.** O. Linfonodo sentinela. In: Daleck C. R. & de Dardi A.B. (Eds). *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, pp. 128-132.
- 2 **Branco A.W., Kondo W. 2007.** Linfadenectomia por vídeo-laparoscopia no câncer de próstata. *Revista brasileira de videocirurgia*. 5(3): 121-127.
- 3 **Brenet O., Lalourcey L. & Queinnec M. 2013.** Hypersensitivity reactions to patent blue v in breast cancer surgery: a prospective multicentre study. *Acta Anesthesiology Scandinava*. 57(1): 106-117.
- 4 **Castelo D., Figueiredo A. Parada B., Nunes P. & Mota A. 2010.** O papel da linfadenectomia pélvica nos doentes submetidos a prostatectomia radical. *Acta urológica*. (4): 17-27.
- 5 **Cowell R.L., Dorsey K.E. & Meinkoth J.H. 2003.** Lymph node cytology. *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice*. 33(1): 47-67.
- 6 **de Nardi A.B., Ferreira T.M.M.R. & Assunção K.A. 2016.** Neoplasias mamárias. In: Daleck C.R. & de Nardi A.B. (Eds). *Oncologia em cães e gatos*. São Paulo: Roca, pp. 498-516.

- 7 **Jeudy G. Louvier N., Rapennes T., Goujon E., Fraisse J., Dalac-Rat S. & Collet E. 2008.** Immediate patent blue-induced hypersensitivity during sentinel node detection: the value of cutaneous tests. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*. 135(6): 461-465.
- 8 **Justino R.C., Cardoso G.S., Trautwein L.G.C., Dessunti G.T., Oliveira D.V., Bernardes R. & Martins M.I.M. 2014.** Uterine lymphangiography: comparison of two methods for locating the medial iliac lymph node. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(11): 1121-1126.
- 9 **Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Constantinidis T.C. & Dessiris A. 2005.** Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *Journal of Comparative Pathology*. 133(4): 246-252.
- 10 **Maranhão M.V.M., Nóbrega D.K.A, Anunciação C.E.C., Maia B.A.B. & Mariano P.V.D. 2016.** Allergic reaction to patent blue dye in breast surgery – case report. *Brazilian Journal of Anesthesiology*. 66(4): 433-436.
- 11 **Miyashiro I., Kishi K., Yano M., Tanaka K., Motoori M., Ohue M., Ohigashi H., Takenaka A., Tomita Y. & Ishikawa O. 2011.** Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. *Surgical Endoscopy*. 25(5): 1672-1676.
- 12 **Patsikas M.N., Karayannopoulou M., Kaldrymidou E., Papazoglou L.G., Papadopoulou P.L., Tzegas S.I., Tziris N.E., Kaitzis D.G., Dimitriadis A.S. & Dessiris A.K. 2006.** The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anatomia, histologia e embryologia*. 35(4): 228–234.
- 13 **Pereira C.T., Rahal S.C., de Carvalho Balieiro J.C. & Ribeiro A.A. 2003.** Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anatomia, histologia, embryologia*. 32(5): 282-290.

- 14 **Pinheiro L.G.P., Moraes M.O., Soares A.H., Lopes A.J.T., Naguère M.A.S.P., Gondim F.A.L., Brandão C.B., Nascimento D.C.H., Soares J.P.H. & Silva J.M.M. 2003.** Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio tc99. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 18(6): 545–552.
- 15 **Pinheiro L.G.P., Oliveira Filho R.S., Vasques P.H.D., Filgueira P.H.O., Aragão D.H.P., Barbosa P.M.E., Beserra H.E.O. & Cavalcante R.V. 2009.** Hemosiderin. A new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 24(6): 432-436.
- 16 **Suga K., Karino Y., Fujita T., Okada M., Kawakami Y., Ueda K., Yuan Y. & Matsunaga N. 2007.** Cutaneous drainage lymphatic map with interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography using iopamidol: preliminary results. *Lymphology*. 40(2): 63-73.
- 17 **Wainstein A.J.A., Barbosa L.C.C.S., Kansaon M., Salomé M. & Drummond-lage A.P. 2015.** Advanced malignant melanoma during pregnancy: technical description of sentinel lymph node biopsy followed by radical lymph node dissection. *Revista Brasileira de Saúde Materna Infantil*. 15(4): 447-450.
- 18 **Wells S., Bennett A., Walsh P., Owens S. & Peuroi J. 2006.** Clinical usefulness of intradermal fluorescein and patent blue violet dyes for sentinel lymph node identification in dogs. *Veterinary and Comparative Oncology*. 4(2): 114-122.





**Figure 1.** Images of intrauterine lymphatic mapping and lymphadenectomy (medial iliac) of a seven-year-old, 13.4 kg, female canine. A- Exposure of uterine body for insertion of insulin needle coupled in a 1 ml syringe for intraparenchymal administration of 1% methylene blue. B- Uterine mapping with 1% methylene blue after intraparenchymal intrauterine administration. C- Visualization of the medial iliac lymph node (arrow), located laterally to the ureter and descending colon, after staining with 1% methylene blue. D- Clear lymphatic mapping with 1% methylene blue of the non-infarcted medial iliac lymph node (arrow) after dissection.

**3 ARTIGO 2 – IMPORTANCE OF MEDIAL ILIAC LYMPH NODE REMOVAL IN FEMALE DOGS WITH MAMMARY GLAND TUMORS**

**Artigo a ser submetido para publicação no periódico:**

Veterinary Surgery

Running head: Lymphadenectomy in dogs with mammary tumors

**Importance of medial iliac lymph node excision in female dogs with mammary gland tumors**

João Pedro S Feranti, DVM<sup>1</sup>; Maurício V Brun, DVM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Small Animals Clinical Sciences, Santa Maria, RS - Universidade Federal de Santa Maria

**Financial support**

This study was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) – process no. 444045/2014-7 and 308019/2015-6.

**Disclosure statement**

The authors declare no conflict of interest related to this report.

**Corresponding author**

Dr. Maurício Veloso Brun, DVM.

Department of Small Animals Clinical Sciences, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Avenida Roraima, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

E-mail: [mauriciovelosobrun@hotmail.com](mailto:mauriciovelosobrun@hotmail.com). CNPq/Brasil grant recipient.

**Abstract**

**Objective:** To check the efficacy of intrauterine and intradermal injection of methylene blue (MB) for visualization of medial iliac lymph nodes (MILNs), establishing whether MILN excision plays an important role in the treatment of dogs with mammary gland tumors.

**Study design:** Prospective randomized clinical trial.

**Animals:** Client-owned dogs.

**Methods:** Thirty-eight female dogs with mammary tumors were divided into GI and GU groups. In GU ( $n=17$ ) the MILNs were stained using intrauterine MB, followed by unilateral lymphadenectomy, OVH, and unilateral mastectomy. GI ( $n=21$ ) animals were subjected to the same procedures using intradermal MB (around M5).

**Results:** MILNs were stained in 14 animals in GU. In GI, stained MILNs were observed within 1 min after MB injection ( $n=21$ ). Histopathological analysis showed malignancy in 84.21%. Among the 32 patients with malignant tumors, there was metastasis to MILNs in three from GI and in two from GU, with MILN involvement in 15.62%. All MILNs with metastasis were stained with MB.

**Conclusions:** Both MILN staining techniques were efficient in female dogs with mammary gland tumors, but intradermal administration yielded the best outcomes. Given the possibility of metastases (approximately 13% of the MILNs), MILN excision should be indicated for the treatment of dogs with mammary gland tumors that require celiotomy.

**Clinical significance:** The present study demonstrated the efficiency of iliac lymph node staining with 1% MB, especially when injected intradermally, and also underscores the importance of MILN excision in female dogs with this disease.

**Keywords:** Mastectomy, mammary gland tumor, lymphadenopathy, cancer, dogs.

## 1. INTRODUCTION

Most mammary gland tumors are malignant and, in 25% of such cases, metastases to regional lymph nodes are observed at diagnosis, in addition to occasional metastases to the lung parenchyma. Although undetectable by plain radiographs, micrometastases may be present in several cases.<sup>1</sup>

The lymphatic system plays a crucial role in local control of tumorigenesis and in the transport of tumor cells, which is the most common process of metastatic spread.<sup>2</sup> While many studies investigate the mammary lymphatic system of dogs, this system has been actually poorly assessed regarding the communication between mammary lymphatic chains, both in healthy animals and in those with mammary gland tumors.

Souza et al.<sup>3</sup> evaluated intra-abdominal inguinoiliac lymphadenectomy in healthy animals after intradermal lymphatic staining around the inguinal mammary gland with methylene blue (MB) and indocyanine green; however, they did not succeed in harvesting the lymph nodes. The relationship between medial iliac lymph nodes (MILNs) and drainage of uterine horns and corpus was assessed by Justino et al.<sup>4</sup> with the aim of helping establish an early diagnosis of uterine disorders, highlighting the fact that the iliac lymph node chain receives most of its drainage via the uterine horns.

For prostate cancer in humans, pelvic lymphadenectomy is considered the most accurate staging procedure, and some studies have addressed the therapeutic possibility of this technique, despite yet inconsistent data. However, it is widely known that lymph node status and distance metastases are strongly associated and, consequently, lymph node involvement is an important indicative sign of metastatic potential in cancers.<sup>5,6</sup>

The aim of the present study was to assess the efficiency of lymphatic staining of MILNs with intrauterine or intradermal MB injection in female dogs with mammary gland tumors.

Metastatic spread into MILNs and the importance of lymphadenectomy in animals with mammary gland tumors were also assessed.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Dogs**

This study was approved by the local Animal Welfare and Ethics Committee (process no. 043/2013), and an informed consent form was signed by the owners after full explanation about the techniques, risks, and consequences. Animals with mammary gland tumors, for which mastectomy was recommended as treatment option, were selected. All patients belonged to economically underprivileged owners, and the surgeries were performed at a low cost or, in some cases, free of charge.

A total of 38 female dogs aged  $9.9 \pm 2.5$  years, weighing on average  $10.7 \pm 4.2$  kg, with tumors (ulcerated or not) in different mammary glands, were included in the study. Prior to the surgical procedure, the patients underwent clinical, laboratory, and imaging evaluations. Preoperative tests included hemogram and biochemistry for determination of creatinine, urea, albumin, alanine-aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP), in addition to screening of metastization by chest radiographs in three positions and by abdominal ultrasound.

Surgically neutered animals or those whose abdominal ultrasound and chest radiograph suggested metastization were excluded from the study.

### **2.2 Anesthetic and analgesic protocol**

Fifteen minutes after premedication (0.3 mg/kg of methadone intramuscularly (IM)), Ringer's lactate solution (5 mL/kg/h intravenously (IV)) was administered as fluid therapy, and propofol (4 mg/kg IV) was used for anesthetic induction. Anesthetic maintenance consisted of inhaled isoflurane using 100% oxygen in a circuit without rebreathing.

The dogs were placed in dorsal recumbency and the dorsalis pedis artery was punctured using a 24G catheter connected to a pressure transducer for invasive measurement of systolic blood pressure (SBP), mean arterial pressure (MAP), and diastolic blood pressure (DBP) in a



multiparameter monitor. The parameters were recorded every 10 minutes. If SBP and heart rate increased by more than 20% of the baseline value, fentanyl sulfate (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  IV) was used for rescue analgesia.

At the end of the surgery, an infiltrative local block with bupivacaine (4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) was performed around the surgical wound for postoperative analgesia. The following medications were used: meloxicam (0.1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  once daily for 4 days), tramadol (5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  four times a day for 5 days), and dipyron (25  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  three times a day for 3 days). The first dose of which was given intravenously, with subsequent doses administered subcutaneously.

### **2.3 Surgical procedures**

All patients were positioned in dorsal recumbency and had a urinary catheter (Foley 10Fr) placed for bladder emptying, which was maintained throughout the intraoperative period. Pre-surgical asepsis was performed with 2% chlorhexidine degerming followed by 0.5% chlorhexidine-alcohol. All surgical procedures were always performed by the same surgeon and anesthetist with expertise in the proposed technique.

The patients were randomly (by draw) divided into two groups (GI and GU). In GU (17 animals), lymphatic staining with 1% MB injected into the uterus (intramurally into the uterine corpus), followed by MILN excision, OVH, and unilateral mastectomy, was performed after retroumbilical celiotomy and exposure of the uterine corpus. In GI (21 animals), OVH by retroumbilical celiotomy was initially carried out, followed by lymphatic staining with 1% MB given intradermally (around M5) and subsequent MILN excision, celiorrhaphy, and later unilateral mastectomy.

The volume of 0.5 mL of 1% MB was used for all animals. Lymphadenectomy (left or right) varied, depending on the involvement of the mammary chain. In those animals with tumor

in the right mammary chain, the right iliac lymph node was excised, whereas those with tumor in the left mammary chain had the left MILN excised.

Soon after MB injection in both groups, the blue-stained (or unstained) MILN was identified, displacing the descending colon laterally and the lymph node was dissected next to the ureter, below the retroperitoneal adipose tissue, at the bifurcation of the iliac artery, using gaze and a Crile curved hemostatic forceps.

All excised tissues (ovary, uterine horns and corpus, MILN, mammary chain) were harvested and sent for histopathological analysis immediately after the surgical procedure and for establishment of any correlation between the histological findings on intracavitary lymph nodes (in case any of them contained tumor cells) and those of mammary gland tumors and of extracavitary regional lymph nodes.

### 3. RESULTS

In GU, right after administration of the dye, it was possible to visualize the blue-stained lymphatic vessels of the uterine corpus and mesometrium and, 1 min after MB administration, we sought to identify the MILN on the side affected by the tumor. Among 14 animals in GU (82.35%), the iliac lymph nodes were remarkably stained in blue; however, they were unstained in three animals, but excised after their detection. In GI, in which the dye was injected intradermally around M5, the blue-stained MILN could be seen in all animals (100%) 1 min after MB administration, even when the lymph nodes were enlarged, thus facilitating lymphadenectomy.

Among the animals in GU, five had ulcerated tumor at the time of the procedure, with enlarged MILN in those patients and in two which had no ulceration, totaling seven animals with MILN enlargement. In GI, 12 dogs exhibited ulceration in the mammary tissue, with MILN enlargement in these 12 patients and in another two which had no ulceration, totaling 14 dogs in GI with MILN enlargement.

No metastases were detected in the animals with benign tumors. Among the 32 dogs with malignant tumors, there was metastasis of mammary tumor to MILNs in five (15.62%); however, MILNs were not enlarged in two patients, but the diagnosis was compatible with metastasis of simple carcinoma. All lymph nodes with metastases of mammary tumor were stained with MB, regardless of presentation. Of the 21 animals with MILN enlargement, there was mammary gland tumor metastasis in three, squamous cell carcinoma in one, and simple carcinoma in two.

After histopathological analysis of mammary gland tumors, 84.2% were considered to be malignant. Of 17 patients with ulcerated tumor, only one was not considered to be malignant. Six tumors were classified as benign, and five of them were not ulcerated.

The tumors affected heterogeneous sites. Single tumors were observed in 27 and multiple tumors in 11 animals. Among all patients, the inguinal mammary gland was the most commonly affected (44.2%), followed by caudal abdominal (28.8%), cranial abdominal (15.4%), and caudal thoracic (11.6%) glands. No patient had a tumor of the cranial thoracic mammary gland. Simple carcinoma was the most frequent type of neoplasm (15 animals), followed by complex carcinoma (10), complex adenoma (4), carcinosarcoma (3), squamous cell carcinoma (2), cribriform carcinoma (1), malignant myoepithelioma (1), benign mixed tumor (1), and tubular mammary hyperplasia (1).

#### 4. DISCUSSION

To the authors' best knowledge, there is no study to date that recommends MILN excision in cases of mammary gland tumor. The results obtained herein indicate that MILN excision should be included as a treatment option for dogs with mammary tumors and those requiring celiotomy, either for OVH or for other procedure. Future studies could elucidate whether abdominal lymphadenectomy (of pelvic lymph nodes and/or of other abdominal lymphatic chains) should or should not be an essential part of mammary gland tumor management in dogs referred to mastectomy, and also whether abdominal/pelvic lymphadenectomy may increase the survival of patients. These questions are important and have to be investigated since, based on our results, the removal of sentinel lymph nodes closer to the tumor might not be enough in most cases.

However, the results obtained herein allow us to asseverate that abdominal lymphadenectomy should be an integral part of treatment, or at least of the staging, of animals with this disease, since a considerable number of patients may present with intracavitary lymphatic metastases at the time of mastectomy.

Our recommendation for lymphadenectomy is valid regardless of the size, location, and characteristics of lymph nodes, because even if these structures are not neoplastic, lymphadenectomy may help with staging and selection of the best postoperative adjuvant therapy. On the other hand, absence of gross findings in the lymph nodes does not rule out the presence of neoplasm.

Not all animals had MILN enlargement, even those with mammary tumors larger than 5 cm in diameter and/or with ulcerated neoplasms. This underscores the importance of lymphatic staining for visualization and excision of lymph nodes, considering that lymph nodes were not enlarged in two patients, but revealed tumor cells in the histopathological analysis.

Understanding of lymphatic flow in animals with metastatic mammary tumors is clinically important as the status of lymph nodes in the clinicopathological analysis is an important prognostic factor given the low survival rate for 85.7% of dogs with lymph node metastases (less than 2 years).<sup>7</sup> The lymph from cranial abdominal mammary glands may drain into the axillary lymph node or into the superficial inguinal lymph node, whereas the lymph from caudal abdominal mammary glands may drain into MILNs,<sup>8</sup> a finding observed in all animals subjected to intradermal staining around the inguinal mammary gland (GI), with blue staining of all lymph nodes, regardless of their size.

There are several methods for the identification of sentinel lymph nodes, such as the use of vital stains, radiopharmaceuticals, or the simultaneous use of both.<sup>3,9-12</sup> MB, used in the present study, was chosen due to some characteristics, such as easy acquisition, low cost, and safe use in dogs. No reactions to MB, like the hypersensitivity described in other studies,<sup>10,13-18</sup> were observed in the present study.

Sentinel lymph nodes may be stained using a broad array of techniques.<sup>3,4,18</sup> Intratumoral or peritumoral injection of vital stains or radiomarkers is the most widely used technique in canine mammary neoplasms, as perineoplastic inoculation has yielded good results, with quicker contrast drainage.<sup>16</sup> In the present study, both techniques revealed a high rate of staining; however, MILNs were stained blue immediately after intradermal administration in all animals from GI, but no staining occurred in three animals from the GU, probably because of lower uterine lymphatic drainage into iliac lymph nodes compared to the drainage of inguinal mammary glands rather than due to obstruction of lymphatic vessels in the region, as the histological analysis did not show presence of neoplastic cells in these three animals.

      Bladder emptying in the preoperative period by placement of a urinary catheter and maintenance of the bladder empty in the intraoperative period was essential for proper

manipulation of tissues and visualization of the MILN, since the lymph node is located at the bifurcation of iliac arteries, right below the urinary bladder. Proper preoperative fasting and reduction of fecal matter, as the colon has to be displaced laterally for proper exposure of the lymph node, aiding with its detection.

In dogs with mammary tumors, lymphatic staining is important for the identification of possible metastases to cellular tissues, indicating the location of lymphatic vessels and regional lymph nodes, thus facilitating surgical excision of these structures with a safety margin. Moreover, lymphadenectomy plays a crucial role, even in the case of lymph nodes that are not enlarged or that have no gross findings, given that tumors have been identified in normal-appearing lymph nodes as well.

In conclusion, intrauterine and intradermal stainings of MILNs in female dogs with mammary tumors were efficient; however, the intradermal technique yielded the best outcomes. Lymphatic staining proves to be an important method for the identification of possible lymph node metastases, facilitating the surgical removal of these structures with a safety margin. In addition, MILN excision should be regarded as part of the treatment or, at least, of the staging of animals with mammary tumors.

## REFERENCES

De Nardi AB, Ferreira TMMR, Assunção KA. Neoplasias mamárias. In: Daleck CR, De Nardi AB, eds. *Oncologia em Cães e Gatos*. 2. ed. São Paulo: Roca; 2016: 498-516.

Cowell RL, Dorsey KE, Meinkoth JH. Lymph node cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2003;33: 47-67.

Souza FW, Brun MV, Feranti JPS, et al. Laparoscopic inguinoiliac lymphadenectomy following staining using different lymphatic markers in healthy dogs. *Cienc Rural*. 2016; 46: 1629-1634.

Justino RC, Cardoso GS, Trautwein LGC, et al. Uterine lymphangiography: comparison of two methods for locating the medial iliac lymph node. *Pesq Vet Bras*. 2014;34: 1121-1126.

Castelo D, Figueiredo A, Parada B, Nunes P, Mota A. O papel da linfadenectomia na prostatectomia radical. *Acta Urol*. 2010;4: 17-27.

Wainstein AJA, Barbosa LCLS, Kansan M, Salomé M, Drummond-Lage AP. Advanced malignant melanoma during pregnancy: technical description of sentinel lymph node biopsy followed by radical lymph node dissection. *Rev Bras Saude Mater Infant*. 2015;15: 447-450.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. *J Comp Pathol*. 2005;133: 246-252.



Reese S, Budras KD, Mulling CRH, Bragulla H, König HE. Integumentum Commune. In: König HE, Liebich HG, eds. *Veterinary Anatomy of Domestic Animals*. 3<sup>rd</sup> edition. New York: Schattauer; 2016: 615-666.

Suga K, Karino Y, Fujita T, et al. Cutaneous drainage lymphatic map with interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography using iopamidol: preliminary results. *Lymphology*. 2007;40: 63-73.

Pinheiro LGP, De Moraes MO, Soares AH, et al. Estudo Experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. *Acta Cir Bras*. 2003;18: 545-552.

Miyashiro I, Kishi K, Yano M, et al. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. *Surg Endosc*. 2011;25: 1672-1676.

Brenet O, Lalourcey L, Queinnec M, et al. Hypersensitivity reactions to Patent Blue V in breast cancer surgery: a prospective multicentre study. *Acta Anesthesiol Scand*. 2013;57: 106-117.

Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*. 2006;35: 228-234.

Jeudy G, Louvier N, Rapennes T, et al. Immediate patent blue-induced hypersensitivity during sentinel node detection: the value of cutaneous tests. *Ann Dermatol Venereol*. 2008;135: 461-465.

Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda MA, Chang DW. Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. *PLoS One*. 2013;8: e69222.

Beserra HEO, Grandi F, Ibañez JF, Rocha NS, Pinheiro LGP. Sentinel lymph node identification: the importance of new methodologies and preclinical studies in dogs. *Braz J Vet Pathol*. 2013;6: 5.

Maranhão MVM, Da Nóbrega DKA, Anunciação CEC, Maia BAB, Mariano PVD. Allergic reaction to patent blue dye in breast surgery – case report. *Braz J Anesthesiol*. 2016;66:433-436.

Suami H, Scaglioni MF, Dixon KA, Tailor RC. Interaction between vascularized lymph node transfer and recipient lymphatics after lymph node dissection-a pilot study in a canine model. *J Surg Res*. 2016;204: 418-427.

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1 – Visualization of medial iliac lymph nodes next to the ureter after staining and impregnation with 1% methylene blue (MB) in different patients and at different sites. (A and B). Evident lymphatic staining with intrauterine injection of 1% MB in a dog with enlarged lymph node. (C and D) Lymph node of normal size visualized after intradermal injection of 1% MB.

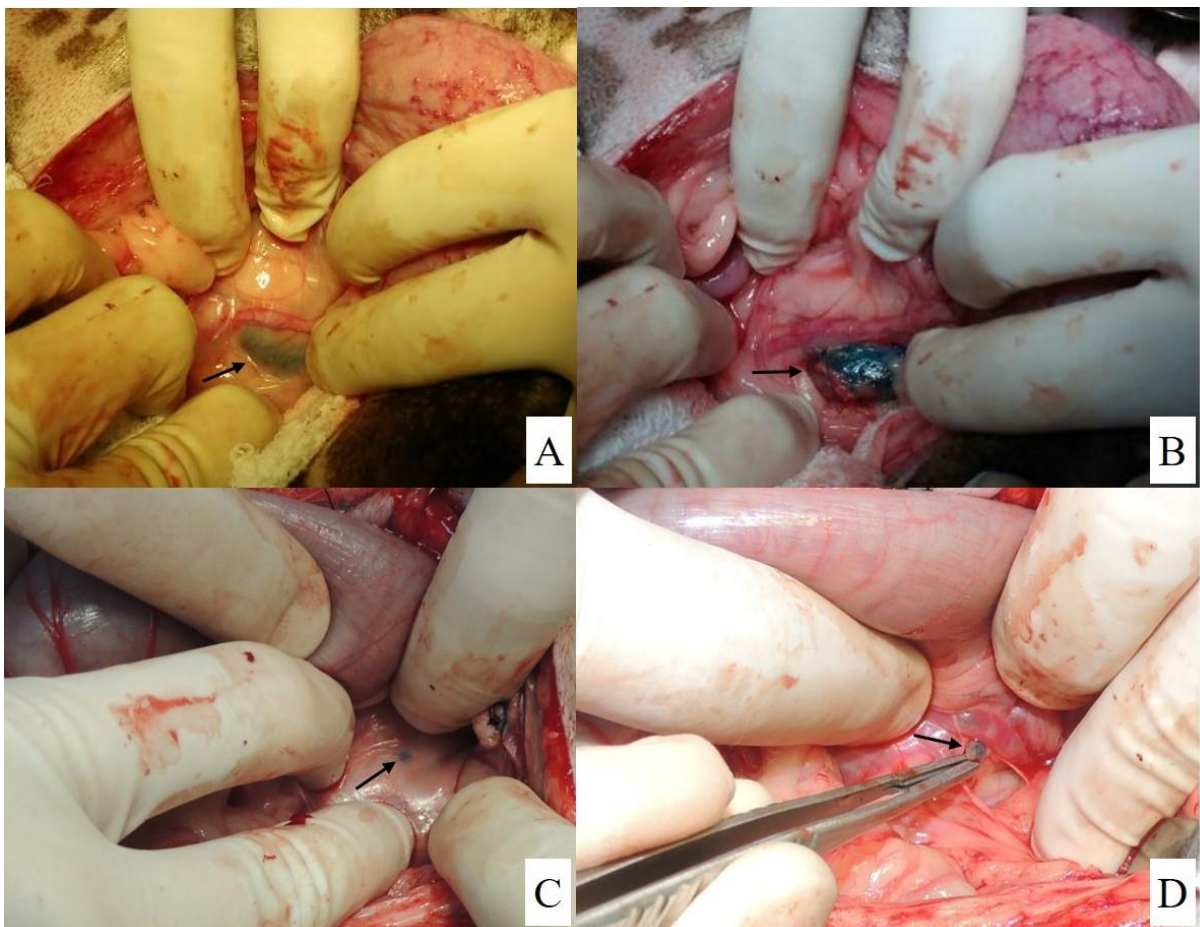
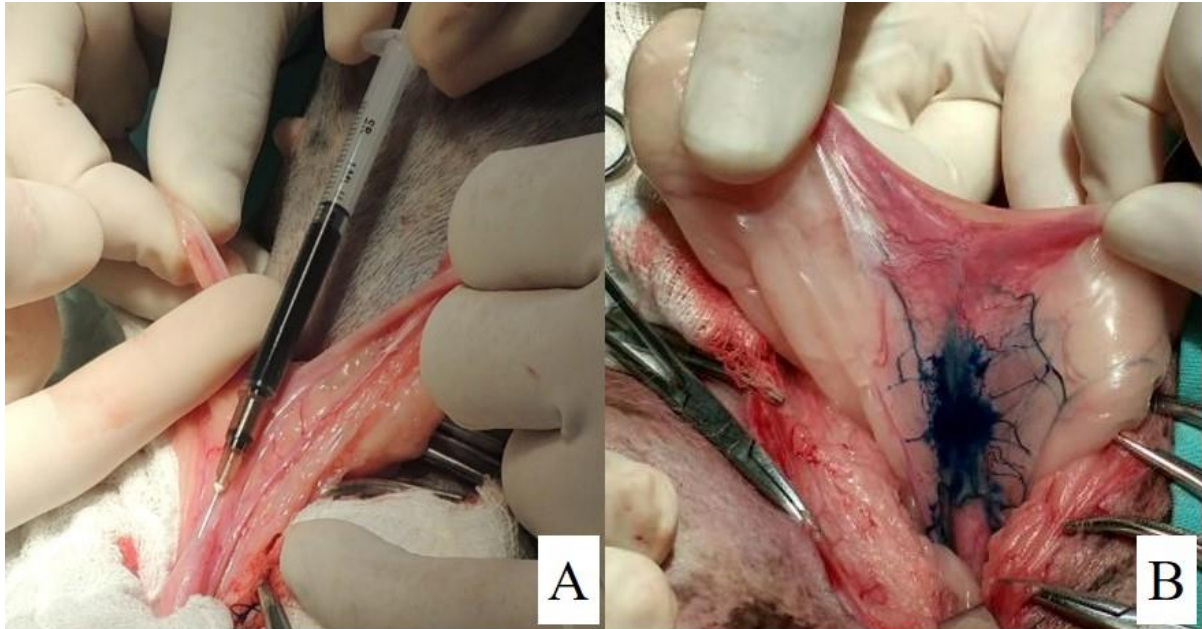


Figure 2 – (A) Exposure of the uterine corpus for insertion of insulin needle coupled to a 1-mL syringe for intraparenchymal administration of 1% MB. (B) Uterine staining and impregnation of lymphatic vessels with 1% MB after intrauterine, intraparenchymatous injection.



## 4 DISCUSSÃO

Ao conhecimento dos autores, até o presente estudo, inexistia a publicação da indicação de linfadenectomia dos íliacos mediais em casos de neoplasma mamário. Com os resultados da presente pesquisa, enfatiza-se que no atual momento, a linfadenectomia dos íliacos mediais da cadeia mamária envolvida faça parte do tratamento de caninos com neoplasmas mamários e que serão submetidos também à celiotomia, quer seja para a realização de OVH ou por outra indicação. Estudos futuros poderão esclarecer se a realização de linfadenectomia abdominal (dos linfonodos pélvicos e/ou até mesmo de outras cadeias linfáticas abdominais) deverá ou não ser parte essencial do manejo de neoplasmas mamários em cães com indicação para mastectomia, bem como se a linfadenectomia abdominal/pélvica poderá ampliar a sobrevida dos animais. Tais questões são importantes e necessitam ser investigadas, já que com esses resultados, verificou-se que a remoção apenas dos linfonodos sentinelas mais próximos ao neoplasma pode ser insuficiente em importante porcentagem dos casos.

Contudo, com os resultados deste trabalho pode-se afirmar que a linfadenectomia abdominal deve ser considerada como parte do tratamento, ou pelo menos do estadiamento, de animais com esta doença, já que considerável número de pacientes já pode apresentar metástases linfáticas intracavitárias por ocasião da mastectomia.

A nossa indicação de linfadenectomia persiste independente do tamanho, localização e apresentação dos referidos linfonodos, uma vez que mesmo que tais estruturas não estejam acometidas pelo neoplasma, a linfadenectomia pode auxiliar no estadiamento e escolha da melhor terapia adjuvante pós-operatória. De outra forma, a ausência de alterações macroscópicas do linfonodo não é uma garantia de que esteja livre de neoplasma.

Nem todos os animais apresentaram linfadenomegalia do íliaco medial, mesmo em pacientes com neoplasma mamário maiores que 5cm de diâmetro e/ou ulcerado, fato esse que chama a atenção para a marcação linfática, afim de facilitar a visualização e extirpação do linfonodo, uma vez que, mesmo em dois pacientes que apresentaram linfonodos não aumentados de tamanho, os mesmos estavam acometidos por células tumorais ao histopatológico.

Destaca-se que a compreensão do fluxo linfático torna-se clinicamente importante no que se refere a metástases em animais com neoplasmas mamários, uma vez que a condição dos linfonodos no exame clínico-patológico é importante fator prognóstico, pois o tempo de sobrevivência é inferior a dois anos para 85,7% dos cães com metástases para linfonodos (KARAYANNOPOULOU et al., 2005). A linfa oriunda das mamas abdominais craniais pode drenar tanto para o linfonodo axilar quanto para o linfonodo inguinal superficial, enquanto a linfa das mamas abdominais caudais e inguinais pode drenar para os linfonodos ilíacos mediais (REESE et al., 2016), fato esse, observado em todos animais submetidos a marcação intradérmica ao redor da mama inguinal (GI), onde visualizou-se a impregnação com azul em todos linfonodos ilíacos mediais correspondentes, independentemente do tamanho linfonodal.

Para o câncer de próstata em humanos, a linfadenectomia pélvica é considerada o procedimento de estadiamento mais exato, sugerindo em alguns trabalhos a possibilidade terapêutica dessa técnica, porém ainda com dados inconsistentes (BRANCO et al., 2007; CASTELO et al., 2010; WAINSTEIN et al., 2015). Em animais, inexistem estudos sobre a possibilidade terapêutica a partir da linfadenectomia, a qual acredita-se que tenha sido paliativa no paciente relatado no Artigo 1, por se tratar de um carcinoma tubulopapilífero com diferentes focos de metástases em linfonodos. De outra forma, a linfadenectomia possibilitou melhor definição do prognóstico e se mostrou como importante ferramenta para estadiamento nesse caso.

Diversos são os métodos de identificação dos linfonodos sentinela, como o uso de corantes vitais, radiofármacos ou da utilização de ambos simultaneamente (SUGA et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009; MIYASHIRO et al., 2010; BRENET et al., 2013; SOUZA et al., 2016). O marcador azul de metileno utilizado no presente estudo foi escolhido por algumas características apresentadas, como a fácil obtenção, baixo custo e a segurança de uso em caninos. Não foram observadas no estudo qualquer tipo de reação após a administração do corante, como as reações de hipersensibilidade observadas em outros estudos (PATSIKAS et al., 2006; JEUDY et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; SUAMY et al., 2013; BESERRA et al., 2016; MARANHÃO et al., 2016; SUAMY et al., 2016).

Várias são as técnicas de marcação dos linfonodos sentinela (SOUZA et al., 2013; JUSTINO et al., 2014; SUAMI et al., 2016). A mais amplamente utilizada em neoplasmas mamários de caninos é a de inoculação de corantes vitais ou

radiomarcadores intratumorais ou peritumorais, uma vez que a inoculação perineoplásica tem demonstrado bons resultados, com maior rapidez na drenagem do contraste (BESERRA et al., 2016). No presente estudo, ambas as técnicas de administração utilizadas tiveram alto percentual de impregnação, porém, em todos os animais do GI, a marcação em azul do linfonodo ilíaco medial foi observada imediatamente após a administração intradérmica, já em três animais do GU, tal marcação não foi visualizada, provavelmente pela menor drenagem linfática uterina para os linfonodos ilíacos em comparação com a drenagem das mamas inguinais e não pela obstrução dos vasos linfáticos presentes na região, uma vez que, nenhum dos três animais apresentaram células neoplásicas na avaliação histológica.

O esvaziamento vesical no pré-operatório por meio de sondagem uretral e a manutenção desta vazia no transoperatório, foi fundamental para correta manipulação dos tecidos e visibilização do linfonodo ilíaco medial, uma vez que o linfonodo localiza-se na bifurcação das ilíacas, justo abaixo da vesícula urinária. Outro aspecto anatômico a se destacar, afim de facilitar a localização do linfonodo, é o adequado jejum pré-operatório e redução do conteúdo fecal, já que o cólon deve ser rebatido lateralmente para adequada exposição do linfonodo.

Em caninos com neoplasmas mamários, torna-se importante a realização de marcação linfática para identificação de possíveis metástases em tecidos celulares, afim de, delimitar os vasos linfáticos e linfonodos regionais, facilitando assim a extirpação cirúrgica destas estruturas com margem de segurança. Além disso, salienta-se a importância da execução da linfadenectomia mesmo para linfonodos que não estejam infartados ou apresentem alterações macroscópicas já que se observou neoplasma mesmo naqueles linfonodos aparentemente normais.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo apresenta importantes inovações associadas ao manejo cirúrgico de neoplasma mamário em cadelas, demonstrando a efetividade da marcação dos linfonodos ilíacos com azul de metileno a 1%, principalmente quando administrado por via intradérmica, bem como ressalta quanto à importância da linfadenectomia pélvica medial em cadelas portadoras dessa afecção. Frente aos resultados alcançados, indica-se que a linfadenectomia dos ilíacos mediais da cadeia mamária envolvida com a neoplasia faça parte do tratamento de caninos com neoplasmas mamários e que serão submetidos à celiotomia para OVH ou por outra indicação, independente do tamanho, localização e apresentação desses linfonodos.



## REFERÊNCIAS

- BESERRA, H. E. O. et al. Sentinel lymph node identification: the importance of new methodologies and preclinical studies in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v.6, n.5, 2013.
- BESERRA, H. E. O. Linfonodo sentinela. In: DALECK, C. R.; De NARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2016. cap. 8, p. 128-132.
- BRAGULLA H.; KÖNIG H. E. Glândula mamária nos animais domésticos (Mamma). In: KÖNIG H. E.; LIEBICH H. **Anatomia dos Animais Domésticos**. (Eds), v.2. São Paulo: Artmed, 1999. p.335-342.
- BRANCO, A. W.; KONDO, W. Linfadenectomia por Vídeo-Laparoscopia no Câncer de Próstata. **Revista Brasileira de Videocirurgia**. v.5, n.3, p.121-127, 2007.
- BRENET, O.; LALOURCEY, L.; QUEINNEC, M. Hypersensitivity reactions to Patent Blue V in breast cancer surgery: a prospective multicentre study. **Acta Anesthesiology Scandinava**. v.57, p.106-117, 2013.
- CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**. v.7, n.2, p.38–69, 2014.
- CASTELO, D.; FIGUEIREDO, A. et al. O papel da linfadenectomia na prostatectomia radical. **Acta Urológica**. v.4, p.17–27, 2010.
- CAVALCANTI, M. F.; CASSALI, G. D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas - revisão. **Revista Clínica Veterinária**. v.11, p.56-64, 2006.
- CHANG, S. et al. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.227, n.10, p.1625-1629, 2005.

COWELL, R. L.; DORSEY, K. E.; MEINKOTH, J. H. Lymph node cytology. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**. v.33, p.47-67, 2003

De NARDI, A. B.; FERREIRA, T. M. M. R.; ASSUNÇÃO, K. A. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; De NARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2016. cap. 40, p. 498-516.

DONNAY, I. et al. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v.56, n.9, p.1188-1194, 1995.

FELICIANO, M. A. R. et al. Estudo clínico, histopatológico e imunoistoquímico de neoplasias mamárias em cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.5, pp.1094, 2012.

JEUDY, G. et al. Immediate patent blue-induced hypersensitivity during sentinel node detection: the value of cutaneous tests. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. v.135, n.6, p.461-465, 2008.

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

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: Application of a human grading method. **Journal of Comparative Pathology**. v.133, n.4, p.246-252, 2005.

KURZMAN, I. D.; GILBERTSON, S. R. Prognostic factors in canine mammary tumors. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**. v.1, n.1, p. 25-32, 1986.

LANA, S. E.; RUTTEMAN, G. R.; WITHROW, S. J. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow e MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 619-636.

LAVERY, H. J. et al. Robotic extended pelvic lymphadenectomy for bladder cancer with increased nodal yield. **British Journal of Urology**, v.107, p.1802-1805, 2010.

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

MARANHÃO, M. V. M. et al. Allergic reaction to patent blue dye in breast surgery – case report. **Brazilian Journal of Anesthesiology**. v.66, n.4, p.433-436, 2016.

MARTINS, D. C.; FERREIRA, A. M. R. Marcadores prognósticos como um auxílio à conduta clínico-cirúrgica em uma cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. **Acta Scientiae Veterinarie**. v.31, p.189-191, 2003.

MISDORP, W. Tumors of the mammary gland. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa State Press: Ames, 2002. p. 575-606.

MIYASHIRO, I. et al. Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. **Surgical Endoscopy**, v.25, n.5, p.1672-1676, 2011.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.30, n.2, p.177-185, 2010.

PARVAIZ, M.A. & ISGAR, B. Anaphylaxis and blue urticaria associated with patent blue V injection. **Anaesthesia**. v.67, p.1275-6, 2012.

PATSIKAS, M. N. et al. The Lymph Drainage of the Neoplastic Mammary Glands in the Bitch: A Lymphographic Study. **Anatomia, Histologia e Embryologia**. v.35, p.228–234, 2006.

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

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.

PINHEIRO, L. G. P. et al. Hemosiderin. A new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.24, n.6, 2009.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.97, n.543, p.119-120, 2002.

REESE, S. et al. 2016. Integumentum commune. In: KÖNIG, H.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 6 ed. São Paulo: ArtMed, cap. 18, pp. 615-666.

SHINZATO, J. Y. et al. Reação anafilática ao corante azul patente durante biopsia do linfonodo sentinela em câncer de mama inicial - Relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.28, p.728-732, 2006.

SORENMO, K. U. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasias. **Veterinary Pathology**. v.48, n.1, p.85-97, 2011.

SOUZA, F. W. et al. Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. **Ciência Rural**. v. 43, n. 4, p. 750-753, 2013.

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

STRATMANN, N. et al. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**. v.37, p.82-86, 2008.

SUAMI, H. et al. Interaction between vascularized lymph node transfer and recipient lymphatics after lymph node dissection-a pilot study in a canine model. **Journal of Surgery Research**. v.204, n.2, p.418-427, 2016.

SUAMI, H.; SHIN, D.; CHANG, D. W. Mapping of lymphosomes in the canine forelimb: comparative anatomy between canines and humans. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v.129, n.3, p.612-620, 2012.

SUAMI, H. et al. Lymphatic territories(lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. **PLoS One**. v.8, n.7, 2013.

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.

TRIPATHY, S.; NAIR, P. V. Adverse drug reaction, patent blue V dye and anaesthesia. **Indian Journal Anaesthesia**. v.56, p.563-566, 2012.

VERONESI, U. et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. **The Lancet**. v.349, p. 1864-1867, 1997.

WAINSTEIN, A. J. A. et al. Advanced malignant melanoma during pregnancy: technical description of sentinel lymph node biopsy followed by radical lymph node dissection. **Revista Brasileira de Saúde Materna Infantil**. v.15, n.4, p.447-450, 2015.

WELLS, S. et al. Clinical usefulness of intradermal fluorescein and patent blue violet dyes for sentinel lymph node identification in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.4, p.114-22, 2006.

WONG, J. H.; CAGLE, L. A.; MORTON, D. L. Lymphatic drainage of skin to a sentinel lymph node in a feline model. **Annals of Surgery**. v.214, n.5, p.637-641, 1991.