

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias
de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total

Simone Passos Bianchi

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total

Autora: Simone Passos Bianchi

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na Área de Morfologia, Cirurgia e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Gomes

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Bianchi, Simone Passos

Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias
mamárias de cadelas submetidas à mastectomia
unilateral total / Simone Passos Bianchi. -- 2015.
49 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.
Coorientador: Cristiano Gomes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. câncer. 2. drenagem linfática. 3. metástase. 4.
azul patente. I. Contesini, Emerson Antonio, orient.
II. Gomes, Cristiano, coorient. III. Título.

Simone Passos Bianchi

Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total.

Aprovada em 16 de março de 2015.

APROVADO POR:

Emerson Antonio Contesini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Jorge Luiz Costa Castro
Membro da Comissão (PUC-PARANÁ)

Prof. Saulo Petinatti Pavarini
Membro da Comissão (UFRGS)

Prof. Carlos Afonso de Castro Beck
Membro da Comissão (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais, os meus maiores incentivadores. Nunca mediram esforços para que eu tivesse educação de qualidade e sempre me apoiaram em todas as decisões, comemorando comigo cada conquista.

Ao meu orientador Emerson Antonio Contesini por me conceder essa oportunidade e me orientar desde que me apaixonei pela cirurgia há oito anos, sempre me dando suporte e me incentivando a me aprimorar cada vez mais.

Ao meu coorientador Cristiano Gomes, por ser além de amigo, um ótimo cirurgião oncológico e por me auxiliar nas mais diversas fases do estudo.

Ao professor Saulo do Setor de Patologia que foi essencial nesse projeto executando a parte de análise das amostras e sempre se mostrou disposto a solucionar meus questionamentos.

Aos doutores Giordano e Wanessa Gianotti por me mostrarem o mundo da pesquisa e por terem feito eu me encantar por ele. Sempre dispostos a me ajudar, consolar e guiar. Admiro muito vocês como pessoas e profissionais.

À Luciana Oliveira e Luciane Vieira por me abrirem as portas dentro do Serviço de Oncologia Veterinária do HCV-UFRGS, apoiando no que fosse preciso, além de ser uma fonte de inspiração de dedicação aos pacientes oncológicos.

À professora Rosemari de Oliveira, um exemplo de amor aos animais e de paixão pela oncologia veterinária.

Aos meus companheiros de pós-graduação Letícia Fratini, Frederico Soares e aos ex-colegas de residência: obrigada pela parceria e pelas risadas.

Às minhas colegas e amigas Verônica Mombach, Fabiane Reginatto e Fernanda Valente, nem sei como agradecer a ajuda em todas as etapas do projeto, sendo exemplos de comprometimento.

À minha colega de pós-graduação Fernanda Loss e à estagiária Amanda Junqueira por todo o auxílio nos procedimentos cirúrgicos e cuidados com os animais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por me fornecer todas as oportunidades de aprendizado dentro dessa instituição.

AO CNPQ pela bolsa concedida que auxiliou na execução desse trabalho.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias que sempre me acolheu em todas as fases (graduação, residência e mestrado), em especial aos professores Carlos Afonso de

Castro Beck e Fernanda Vieira Amorim da Costa por abrirem as portas para realização desse estudo.

Obrigada aos residentes, funcionários e estagiários do HCV-UFRGS que de alguma forma contribuíram nesse estudo.

Aos funcionários e estagiários do Bloco de Ensino e Pesquisa da FAVET-UFRGS por se mostrarem sempre dispostos a ajudar durante os procedimentos cirúrgicos.

Ao meu amor Rafael Rodrigues Ferreira, por ser meu grande companheiro e minha inspiração dentro da Medicina Veterinária. Obrigada por todo o apoio, paciência e carinho. Te amo muito.

Agradeço a todos os animais, Bianca (*in memoriam*), Juninha, Siri e em especial aos meus (Juju e Magali) por estarem sempre me esperando com muito carinho ao fim de cada dia.

Em especial preciso agradecer todos os tutores e pacientes que fizeram parte desse trabalho e muitos dos quais agora fazem parte da minha vida. Sem vocês nada disso seria possível.

RESUMO

O estudo dos tumores de mama que afetam cadelas é de grande importância devido à alta frequência com que surgem na clínica de pequenos animais, sendo a neoplasia mais comum em cadelas. É necessário obter maior conhecimento sobre a circulação linfática na glândula mamária e suas possibilidades de comunicação para que a técnica cirúrgica adequada seja escolhida. O presente estudo teve como objetivo avaliar a importância da retirada do linfonodo axilar com auxílio do corante azul patente em neoplasias mamárias de cadelas. Nesse experimento foram avaliadas 49 cadelas com neoplasia mamária submetidas a mastectomia unilateral total. O corante azul patente 2,5% foi aplicado na região intradérmica periareolar da mama torácica cranial como forma de identificação da drenagem linfática da mama e a localização do linfonodo na região axilar das pacientes. Após sua ressecção, o linfonodo foi submetido a análise histopatológica e imuno-histoquímica para procura de metástase. Como resultado foram encontrados 8 (16,33%) animais com metástase em linfonodo axilar, sendo sete pela histopatologia e um somente pela técnica de imuno-histoquímica usando o anticorpo citoqueratina. Um animal que apresentava nódulo mamário em mama abdominal caudal apresentou metástase em linfonodo axilar, o que sugere que a presença de tumor provoca linfangiogênese, ou seja, neoformação na drenagem linfática perdendo o padrão de drenagem da cadeia mamária já descrito. Esse estudo mostrou que a técnica de coloração de linfonodo axilar foi de fácil execução, facilitou a retirada do linfonodo axilar, sendo indicada sua retirada em mastectomia de cadelas devido à significativa presença de células tumorais no mesmo.

Palavras-chave: azul patente, câncer de mama, metástase linfática.

ABSTRACT

The study of breast tumours affecting dogs is of great importance due to the high frequency in which they occur in clinical small animal, being the most common cancer in dogs. Greater insight must be obtained into the lymphatic circulation in the mammary gland and its communication possibilities for the adequate surgical technique to be chosen. This study aimed to evaluate the importance of the withdrawal of axillary lymph node in breast tumours in bitches with the help of patent blue dye. In this experiment, 49 bitches with mammary tumours undergoing unilateral total mastectomy were evaluated. The 2.5% blue dye was administered intradermally in the periareolar cranial thoracic region of the breast as a means of identifying lymphatic drainage of breast cancer and the location of the lymph node in the axilla of the patient. After resection, the lymph nodes were subjected to histopathologic and immunohistochemical analysis to search for metastasis. We found 8 (16.33%) animals with metastatic axillary lymph node, seven by histopathology and only one by immunohistochemical technique using cytokeratin antibody. One of the animals with caudal abdominal mammary gland tumour was found to have metastasis in the breast axillary lymph, suggesting that the presence of tumour lymphangiogenesis. We found that the axillary lymph node staining technique was easy to perform and facilitated the removal of axillary lymph node. Our results suggest that the removal of the axillary lymph node is indicated in bitches submitted to mastectomy due to the significant presence of metastasis in this ganglion.

Keywords: blue dye, breast cancer, lymphatic metastasis

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Ilustração da localização das glândulas mamárias na cadela e os linfonodos correspondentes (Fonte: adaptado de MADIA, 2015)..... 12
- FIGURA 2** - Aplicação do corante azul patente 2,5% por via intradérmica em região periareolar de mama torácica cranial de cadela com neoplasia mamária. 21
- FIGURA 3** - Retirada de linfonodo axilar (seta laranja) em uma cadela com tumor de mama impregnado com corante azul patente 2,5%, o qual foi aplicado em mama torácica cranial por via intradérmica. 22
- FIGURA 4** - Linfonodo axilar palpável de cadela com tumor de mama palpável em avaliação pré-cirúrgica, no período trans cirúrgico não apresentou qualquer absorção do corante. O mesmo apresentava-se firme e aderido na região axilar (observar interior do círculo laranja)..... 25
- FIGURA 5**- Amostras de linfonodos de cadelas com neoplasia mamária de cadelas submetidas a coloração de hematoxilina-eosina, os quais apresentaram presença de células tumorais apontado pelas setas pretas. A: carcinoma tubulo-papilar; B: carcinoma sólido; C e D: carcinossarcoma. 27
- FIGURA 6**- Linfonodos de cadelas com tumor de mama após técnica de imunohistoquímica com anticorpo citoqueratina revelando células epiteliais (coradas de marrom, apontadas pelas setas pretas). A: carcinoma tubulo-papilar; B: carcinoma e mioepitelioma maligno; C: carcinoma e mioepitelioma maligno com as células localizadas na região subcapsular; D: carcinossarcoma apresentando-se como células epiteliais isoladas. .. 28

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Estadiamento tumoral do câncer de mama em cadelas. Modificado de Sonremo, 2013. 14
- TABELA 2** - Análise estatística da correlação de ocorrência de metástase no linfonodo axilar e mama acometida pelo tumor. * Valor P obtido pelo teste Exato de Fisher 29
- TABELA 3** - Pacientes submetidas a mastectomia que apresentavam metástase em linfonodo axilar, relacionando tipo histológico e estadiamento tumoral. 30

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 9 |
| 2 OBJETIVOS | 10 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 10 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 10 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA | 11 |
| 3.1 Anatomia da glândula mamária canina | 11 |
| 3.2 Neoplasias mamárias em cadelas..... | 12 |
| 3.2.1 Vias de metástase do câncer de mama em cadelas | 13 |
| 3.2.2 Estadiamento tumoral..... | 14 |
| 3.2.3 Tratamento cirúrgico da neoplasia mamária..... | 14 |
| 3.2.4 Linfonodo sentinela..... | 15 |
| 3.2.5 Análise histopatológica e imuno-histoquímica..... | 17 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODO | 18 |
| 4.1 Local do Estudo..... | 18 |
| 4.3 Avaliação clínica e exames complementares..... | 18 |
| 4.4 Anestesia e procedimentos pré-operatórios..... | 19 |
| 4.5 Procedimento cirúrgico..... | 20 |
| 4.6 Cuidados pós-operatórios imediatos com os animais..... | 22 |
| 4.7 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica | 23 |
| 4.9 Análise estatística | 24 |
| 5 RESULTADOS | 25 |
| 5.1 Técnica de coloração com azul patente | 25 |
| 5.2 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos linfonodos | 26 |
| 5.3 Estadiamento tumoral..... | 30 |
| 5.4 Avaliação pós-operatória da região axilar | 31 |
| 6 DISCUSSÃO | 32 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 38 |
| REFERENCIAS | 39 |
| ANEXO 1 | 43 |
| ANEXO 2 | 44 |
| ANEXO 3 | 45 |
| APÊNDICE A | 46 |
| APÊNDICE B..... | 48 |

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias são os tumores mais frequentes em fêmeas caninas. Cadelas com neoplasias mamárias devem ser submetidas a estadiamento para definir prognóstico e protocolo terapêutico da doença, assim como é feito em mulheres. Quando submetidas ao procedimento cirúrgico de mastectomia, o linfonodo inguinal por sua posição anatômica é retirado junto da mama correspondente. Entretanto o linfonodo axilar somente é retirado quando se observa alteração na palpação do mesmo. Isso ocorre, em parte, devido à dificuldade de sua localização e pela falta de estudos que comprovem a importância de sua remoção (CASSALI et al., 2014).

O linfonodo sentinela (LNS) é definido como o primeiro gânglio linfático a drenar uma neoplasia, e por esta razão deve ser o primeiro sítio a receber células tumorais se ocorrer disseminação linfática (PAZ et al., 2001, TUOHY et al., 2009). Cada vez mais tem sido observado que quando há presença de tumor na cadeia mamária, a drenagem linfática não segue o padrão descrito pela literatura, o que se deve à linfangiogênese estabelecida pela presença do câncer. Estudos demonstram que linfonodos correspondentes a regiões que possuem neoplasia mesmo sem apresentar alteração de tamanho e consistência podem já estar com metástase (BESERRA, 2014).

Esse estudo tem como objetivo avaliar a técnica de coloração de linfonodo axilar e submeter o mesmo à análise histopatológica e imuno-histoquímica avaliando assim a importância de sua retirada em mastectomia de cadelas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o linfonodo axilar como sentinela em neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliação clínica do linfonodo axilar através da verificação de mobilidade, consistência e tamanho.
- Avaliar a técnica de marcação linfática com o corante azul patente.
- Avaliar a presença de células tumorais no linfonodo axilar em mastectomias unilaterais totais de cadelas através de método histopatológico e imuno-histoquímico.
- Avaliação da morbidade pós-operatória devido a manipulação da região axilar.
- Correlacionar a presença de metástase com a mama acometida pela neoplasia.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia da glândula mamária canina

A mama é uma glândula sudorípara apócrinas modificadas encontradas apenas em mamíferos (SONREMO et al., 2011). A cadela possui cinco pares de glândulas mamárias, denominadas, de cranial para caudal, torácicas craniais (M1), torácicas caudais (M2), abdominais craniais (M3), abdominais caudais (M4) e inguinais (M5), embora que, excepcionalmente, possa apresentar apenas quatro pares (ZUCCARI et al., 2002; MURPHY, 2008). As glândulas mamárias ficam dispostas em duas fileiras separadas, estendendo-se das regiões torácica à inguinal (SWAIN, 2007)

Em cadelas saudáveis a circulação linfática promove a drenagem de glândulas homolaterais, mas não existe contato direto entre as cadeias direita e esquerda. Todas as glândulas têm drenagem independente para o linfonodo mais próximo. No entanto, as glândulas abdominais craniais são as únicas que drenam simultaneamente para o linfonodo axilar acessório e para os linfonodos inguinais superficiais (ZUCCARI et al., 2002; MURPHY, 2008).

Já em cadelas com neoplasia mamária, a drenagem para linfonodos regionais depende da localização do tumor na glândula mamária, tendo duas regiões para drenagem. As mamas torácicas e em alguns casos a mama abdominal cranial drenam para o linfonodo axilar e eventualmente para os linfonodos cervicais superficiais. A mama abdominal caudal e a mama inguinal tem a drenagem para o linfonodo inguinal superficial. Há casos em que a glândula tem drenagem dupla, indo ao linfonodo axilar e ao inguinal superficial, o que mostra heterogeneidade e plasticidade do sistema linfático da cadela (STAN et al., 2010). Drenagem para o linfonodo contralateral também já foi reportada, devido à neoformação de vasos linfáticos (linfangiogênese) induzida pelo tumor. Foi observado que coletar amostra somente do linfonodo mais próximo ao nódulo não tem sido suficiente para um correto estadiamento tumoral e pode ser negligenciada a presença de doença locorregional (SONREMO et al., 2013).

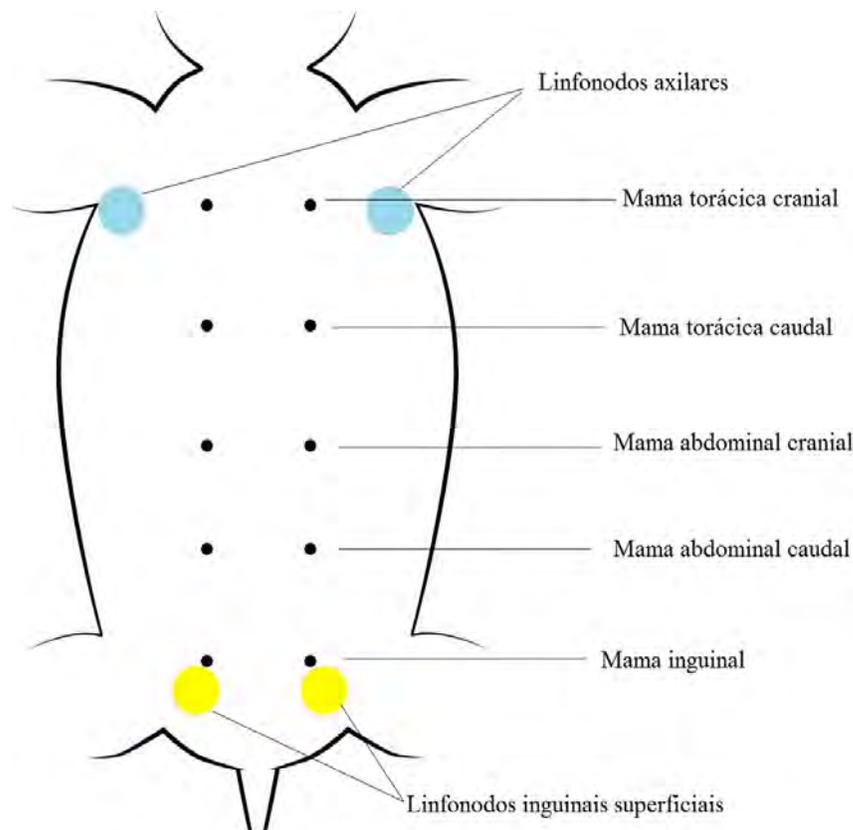


Figura 1. Ilustração da localização das glândulas mamárias na cadela e os linfonodos correspondentes (Fonte: adaptado de MADIA, 2015).

3.2 Neoplasias mamárias em cadelas

Tumores de glândulas mamárias representam a neoplasia mais comum em cadelas não castradas (SLECKX et al., 2013; SONREMO et al., 2013). Destas, 41 a 53% são de caráter maligno. Entretanto, pesquisas brasileiras sugerem que os tumores mamários malignos compreendem 60 a 82% dos diagnósticos (TERRA & VARALLO, 2013). As formações neoplásicas podem ser únicas ou múltiplas, sésseis, móveis, císticas, ulceradas, inflamadas, com uma ampla variação de tamanho (milímetros a centímetros) (SONREMO et al., 2013). Tumores de mama geralmente são encontrados em cadelas não castradas ou que foram castradas tardiamente. Outros fatores de risco importante são a idade e a exposição hormonal, além de raça, dieta e obesidade (SONREMO et al., 2011).

Durante o processo de desenvolvimento dos tumores mamários ocorre angiogênese e linfangiogênese. A formação desses novos vasos sanguíneos e linfáticos é essencial para invasão e metástase tumoral (SLECKX et al., 2013). A inspeção do

linfonodo regional deve fazer parte da rotina de avaliação dos tumores de mamas em cadelas pois a presença de metástase tem impacto no estadiamento tumoral do câncer, na sobrevida e no tratamento a ser determinado (CASSALI et al., 2014).

Biópsia aspirativa por agulha fina é recomendada para auxiliar no diagnóstico e, portanto, ajudar no planejamento cirúrgico para muitos tipos de tumores. Também pode ser útil em alguns tipos de tumor mamário, mas pode não ser confiável, devido à heterogeneidade dos tipos histológicos mais comuns (MURPHY, 2008).

3.2.1 Vias de metástase do câncer de mama em cadelas

O sistema linfático é um componente vital do sistema cardiovascular e é composto de vasos linfáticos, linfonodos e linfa. Os linfonodos localizam-se em toda parte do corpo, são circundados por tecido adiposo e estão intimamente associados a grandes vasos sanguíneos. São estruturas reniformes, revestidas por uma cápsula delgada de musculatura lisa e fibras elásticas. Os avanços recentes no diagnóstico por imagem, dissecação anatômica e no exame histológico têm possibilitado a pesquisa mais detalhadas desse sistema (HARDIE & PETRUS, 2007). O sistema linfático desempenha um papel importante no transporte de células tumorais e por isso representa a via mais comum de metástases em neoplasias (PEREIRA et al., 2003; PATSIKAS et al., 2006).

A presença de metástases nos linfonodos axilares é um dos fatores mais importantes no estadiamento e avaliação prognóstica de mulheres com câncer de mama. O tamanho do tumor primário, o tipo e grau histológicos também são fatores importantes e associados a metástases. Tumores maiores que dois cm têm maior chance de estarem associados a metástases em linfonodos no momento do diagnóstico. Tumores com alto grau histológico apresentam maior tendência a metástases em mulheres (MARINHO et al., 2008).

Em geral, os tumores epiteliais malignos fazem metástase por via linfática e os sítios mais comuns são os linfonodos regionais, pulmões e fígado (TERRA & VARALLO, 2013). O componente epitelial normalmente gera metástase por via linfática para os linfonodos regionais e pulmões enquanto o componente mesenquimal produz metástase por via hematogênica até os pulmões (SORENMO et al., 2011).

Presença de metástase em linfonodo axilar é preocupante pois por fazer parte do centro linfático axilar, encontra-se muito próximo de outros centros linfáticos importantes como cervical superficial e torácico ventral (PEREIRA et al., 2003).

3.2.2 Estadiamento tumoral

A determinação do estágio clínico do tumor ajuda a entender a gravidade do tumor e sugere o prognóstico e tratamento adequado a ser instituído (CASSALI et al., 2014). O mínimo de exames a ser realizado para correto estadiamento são: exame de sangue (hemograma e bioquímicos), radiografia torácica em três posições e ultrassonografia abdominal (CASSALI et al., 2014; SONREMO et al., 2013).

O estadiamento clínico é determinado de acordo com o sistema TNM e estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores de mama caninos (Tabela 1). Baseado nesse sistema, o tamanho da lesão primária (T), a presença de metástase em linfonodo regional (N) e a presença de metástase a distância (M) podem ser classificados (CASSALI et al., 2014; SONREMO et al., 2013). O tamanho é considerado um fator prognóstico independente dos demais fatores para tumores de mama em cadelas. Nódulos com três centímetros ou menores tem uma correlação significativa com melhor prognóstico comparado a neoplasias maiores. Esse parâmetro pode ser facilmente obtido e deve ser considerado na tomada de decisões de terapia complementar. (CASSALI et al., 2014).

Tabela 1. Estadiamento tumoral do câncer de mama em cadelas. Modificado de Sonremo, 2013.

Estadiamento tumoral do câncer de mama em cadelas. Modificado de Sonremo, 2013.

| Estágio | Tamanho tumoral | Status linfonodal | Metástase à distância |
|---------|------------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | T1: < 3 cm | N0 | M0 |
| 2 | T2: 3-5 cm | N0 | M0 |
| 3 | T3: > 5 cm | N0 | M0 |
| 4 | Qualquer tamanho | N1 (positivo) | M0 |
| 5 | Qualquer tamanho | Qualquer | M1 (metástase) |

3.2.3 Tratamento cirúrgico da neoplasia mamária

Existem diversas técnicas cirúrgicas relacionadas ao tratamento do tumor de mama em cadelas. A literatura cita a lumpectomia simples, mastectomia, mastectomia regional, mastectomia unilateral de toda a cadeia ou mastectomia bilateral. A técnica geralmente é definida conforme o caso e explicado ao tutor as vantagens e desvantagens

de cada uma e considera o fato de só remover o tumor com margem cirúrgica ou mastectomia profilática de mamas clinicamente normais junto com as mamas afetadas. Um estudo mostrou que em 99 cadelas, todas não castradas, a técnica escolhida interfere no prognóstico da doença. Nesses animais foi realizada somente a lumpectomia ou a mastectomia simples da mama afetada. De todas, 58% desenvolveram tumor na cadeia ipsilateral em uma ou mais das mamas restantes que não haviam sido retiradas. Os autores defendem a realização da mastectomia unilateral total para tumor de mama único (STRATMANN et al., 2008).

Um estudo retrospectivo incluindo apenas cães com carcinoma que tiveram o linfonodo removido ou submetido a biópsia, mostrou que o seu *status* é um fator altamente prognóstico. Outros estudos confirmaram esses achados. A informação sobre o *status* do linfonodo é extremamente importante quando se considerada a necessidade de terapia adjuvante em cadelas com tumores de mama (SORENMO et al., 2013).

3.2.4 Linfonodo sentinela

O linfonodo sentinela (LNS) é definido como o primeiro linfonodo a drenar uma neoplasia, e por esta razão será o primeiro sítio a receber metástases se ocorrer disseminação linfática (PAZ et al., 2001, TUOHY et al., 2009). A primeira descrição de mapeamento de linfonodo sentinela em animais foi feita em gatos há 20 anos (SONREMO et al., 2013).

A biópsia do LNS possibilita a preservação dos demais linfonodos da axila, reduzindo a morbidade pós-operatória no câncer de mama em mulheres (PIATO et al., 2008). Como a metástase em linfonodo (LN) é um dos fatores prognósticos mais importantes para a sobrevivência em animais, a avaliação do LN regional é essencial no estadiamento do câncer de mama, a fim de determinar o prognóstico e determinar tratamentos adjuvantes ideais. O procedimento de remoção do LNS consiste em reconhecer e remover o primeiro LN (s) que drena o fluido linfático do tumor. Na mulher, o uso do mapeamento do LNS tem alterado significativamente o tratamento do câncer de mama pois determina a abordagem terapêutica de cada caso. Técnicas de estadiamento dos linfonodos devem ser reconsideradas na cadela. O mapeamento significa detectar quais linfonodos estão drenando o tumor e, portanto, onde existe a maior probabilidade de encontrar metástase (SORENMO et al., 2013).

O *status* linfonodal é feito pela identificação do linfonodo sentinela e atua como fator prognóstico em tumor de mama e tem importância na determinação da conduta

terapêutica. Apesar de saber disso, há poucos estudos relacionados a linfangiogênese e microsuptimento linfático da glândula mamária (CASSALI et al., 2014).

Na rotina da medicina veterinária, linfonodos somente são submetidos a punção ou biópsia incisional/excisional se estiverem alterados na palpação, o que leva a um estadiamento inapropriado. Um estudo realizado em 100 animais com melanoma mostrou que não é confiável relacionar entre a palpação do linfonodo e a presença de metástase no mesmo e que portanto, a palpação não poderia definir o estadiamento de forma segura (TUOHY et al., 2009; WILLIAMS & PACKER, 2003).

Em caninos submetidos a procedimentos cirúrgicos, a decisão da técnica cirúrgica geralmente é baseada na facilidade de acesso e presença de linfonodos palpáveis. Como um resultado disso, o linfonodo inguinal geralmente é removido junto a mama inguinal enquanto o linfonodo axilar raramente é avaliada (somente quando palpável) devido à potencial morbidade por estar localizado junto a importantes estruturas na axila (artéria, veia e nervos) (TUOHY et al., 2009).

O estado linfonodal é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama em mulheres e tem se mostrado repetidamente como o indicador mais importante de sobrevida livre da doença e sobrevida global. Apenas 20% a 30% das pacientes com nódulo negativo desenvolverão recidiva no prazo de 10 anos, em comparação com cerca de 70% dos pacientes com envolvimento de linfonodo axilar (BUITRAGO et al., 2011).

Um dos desafios do estadiamento é a incapacidade de visibilizar o LN, resultando em falhas que podem levar a um tratamento de qualidade inferior ou em recorrência axilar. Diferentes corantes azuis têm sido utilizados para o procedimento de marcação do linfonodo sentinela, sendo os corantes azul isosulfan e azul patente aprovados para uso de procedimento em humanos. Os benefícios do uso de corante incluem maior facilidade na identificação dos nódulos linfáticos em situação de risco transoperatório com mínimas incisões cirúrgicas e com eficiência, especialmente para os linfonodos axilares raramente avaliados (SORENMO et al., 2013). Além desses, os corantes azul de metileno, iopamidol e verde de indocianina também podem ser indicados para detecção do LNS, além de hemossiderina (pigmento de ferro) (SOUZA et al., 2012). Após injeção, o corante é drenado pelo sistema linfático, permitindo a visualização da cadeia linfática regional durante o procedimento cirúrgico (EL KHATIB et al., 2011).

Em um estudo realizado com cães, observou-se a difusão do corante azul de metileno para a cadeia linfática, corando vasos linfáticos e linfonodos, os quais

apresentaram-se corados após 10 minutos da aplicação. A utilização do corante azul de metileno foi útil na localização do linfonodo sentinela já que nenhum outro tecido foi corado pelo mesmo. Avaliação histopatológica deste linfonodo auxiliou no estadiamento do tumor e consequentemente no estabelecimento do prognóstico da paciente (CAMPOS et al., 2007). Essa técnica é de baixo custo e fácil execução, não havendo necessidade de treinamento prévio, e pode ser aplicada com sucesso na rotina cirúrgica de pequenos animais. (KHATIB et al., 2011).

3.2.5 Análise histopatológica e imuno-histoquímica

Linfonodos podem apresentar metástase (detectadas pela técnica de rotina hematoxilina e eosina) ou micrometástases, o que se refere à disseminação sistêmica de um pequeno número de células tumorais que não são detectadas por histopatologia e que podem ser a grande responsável pela doença metastática em pacientes inicialmente diagnosticado como linfonodo negativo (TUOHY et al., 2009).

A imuno-histoquímica (IHQ) teve grande desenvolvimento a partir da década de 1970, quando foi possível demonstrar antígenos teciduais pela técnica de imuno-peroxidase em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Atualmente, a IHQ está incorporada à patologia cirúrgica como método diagnóstico complementar (SALLES et al., 2009).

O exame histopatológico rotineiro do linfonodo sentinela consiste no estudo de um único corte histológico corado pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). Esse método tem se mostrado incapaz para descartar ou confirmar a presença de metástase do tumor primário e não apresenta a acurácia esperada, uma vez que em parte significativa dos casos em que o LS foi considerado livre existiam metástases que foram detectadas por técnicas de exame imuno-histoquímico (PIATO et al., 2008).

Em humanos é comum a utilização de citoqueratina para detectar micrometástases ocultas em linfonodos regionais. Ao utilizar essa técnica é possível avaliar prognóstico relacionado ao intervalo livre de doença e sobrevida global das mulheres submetidas a linfadenectomia (SONREMO et al., 2011).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Local do Estudo

Esse estudo foi realizado no Bloco Cirúrgico de Ensino e Pesquisa da FAVET da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAVET-UFRGS), no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS) (ANEXO 1) e no Setor de Patologia Veterinária (SPV-UFRGS), após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA) sob o número 26411 (ANEXO 2).

4.2 Delineamento experimental

Foram tratadas 50 cadelas de diferentes raças, com idade variada, provenientes do atendimento do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-FAVET-UFRGS) que apresentavam neoplasia mamária. As pacientes foram selecionadas por meio de divulgação do projeto aos tutores que eram clientes do HCV-UFRGS e aos médicos veterinários do Hospital. Alguns caninos já possuíam alguns exames complementares, mas outros nunca haviam sido submetidos à avaliação do tumor de mama.

Não foram incluídos no estudo cadelas com metástase a distância, que tinham recebido quimioterapia citorrredutora prévia ou que possuísem outra doença concomitante que impossibilitasse a paciente de ser submetida ao procedimento anestésico e cirúrgico. As pacientes não podiam ter sido submetidas a nenhuma cirurgia relacionada às glândulas mamárias.

Todos os tutores se mostraram prestativos na participação, aceitando a inclusão de suas cadelas mesmo sendo avisados de riscos de reação cutânea, presença de coloração azulada na urina e riscos cirúrgicos. Os tutores assinavam antes do procedimento cirúrgico um termo de livre consentimento para a inclusão da paciente no experimento (APÊNDICE A).

4.3 Avaliação clínica e exames complementares

Todas as pacientes encaminhadas para o projeto foram avaliadas clinicamente sempre pela mesma pessoa e por meio dos seguintes parâmetros: coloração de mucosas, tempo de repercussão capilar, ausculta cardiopulmonar, temperatura retal, palpação abdominal. Os linfonodos mandibulares, pré-escapulares, axilares, inguinais e poplíteos

foram avaliados quanto a mobilidade, consistência e tamanho. Foram realizados exames complementares, como exames de sangue (hemograma, alanina-aminotransferase, creatinina), radiografia torácica em três posições (latero-lateral direita e esquerda e ventrodorsal) e ultrassonografia abdominal (para avaliação da presença de doenças concomitantes ou metástases).

Exames de sangue adicionais ou avaliação cardiológica foram realizados quando necessário, de acordo com o quadro clínico da paciente. Cadelas com alterações em exames de sangue ou que apresentassem indício de tumor em outro órgão foram automaticamente excluídos do experimento. Biópsia aspirativa por agulha fina do nódulo mamário pela técnica de capilaridade foi realizada quando havia suspeita de que a origem do tumor não seria da glândula mamária. Após avaliação de todos os resultados, agendava-se o procedimento cirúrgico. Quando havia sinal de dor ou infecção, tutores recebiam prescrição de medicamentos a serem administrados a suas cadelas até o dia da cirurgia.

4.4 Anestesia e procedimentos pré-operatórios

Todas as pacientes foram submetidas à anestesia geral inalatória para a realização do procedimento cirúrgico de mastectomia unilateral total. Somente recebiam medicação pré-anestésica quando muito agitados e não permitiam a tricotomia, casos em que foi utilizada acepromazina 0,03mg/kg por via intramuscular. A tricotomia do campo cirúrgico e da região lombossacra para realização da anestesia epidural foi realizada na sala de pré-operatório na paciente. O acesso venoso foi realizado por cateterização da veia cefálica para administração fluidoterapia de 10 mL/kg/h com solução de cloreto de sódio 0,9%. A indução anestésica foi realizada com propofol (5 mg/kg) por via intravenosa. Na sequência, as cadelas foram intubadas e mantidas com isoflurano vaporizado em oxigênio a 100% em sistema aberto ou semiaberto de acordo com o seu porte.

Sob anestesia geral, as cadelas foram posicionadas em decúbito esternal com os membros pélvicos estendidos para a frente para realização da anestesia epidural, a qual foi realizada com morfina 0,1mg/kg e lidocaína 0,25mg/kg. A troca do protocolo pré-anestésico e anestésico foi realizada somente em caso de necessidade, de acordo com temperamento do animal ou contraindicação no uso de alguma medicação, casos em que recebiam analgésicos por infusão contínua.

Após as pacientes foram posicionados em decúbito dorsal para o procedimento cirúrgico. Sondagem vesical foi realizada para esvaziamento da vesícula urinária e avaliação da urina. Antibioticoterapia profilática foi realizada em todos os procedimentos com ampicilina sódica 22 mg/kg. As cadelas foram monitoradas durante todo o procedimento cirúrgico até completa recuperação anestésica, através da avaliação eletrocardiográfica, bem como frequência cardíaca, frequência respiratória, oximetria e pressão não invasiva.

4.5 Procedimento cirúrgico

Esse estudo utilizou a técnica de mastectomia unilateral total, independente do número de nódulos e posição dos mesmos. Durante todo o procedimento as pacientes foram posicionados sobre colchão térmico para manutenção da temperatura corporal no transoperatório. O corante azul patente 2,5% estéril (Guerbet®) foi aplicado na região periareolar da mama torácica cranial com seringa de 3 ml (agulha 0,7 x 25 mm) por via intradérmica na dose de 2mg/kg, para facilitar localização do linfonodo axilar (Figura 2). O corante foi aplicado sempre pelo mesmo profissional em um único ponto, na região mais próxima a axila.



Figura 2. Aplicação do corante azul patente 2,5% por via intradérmica em região periareolar de mama torácica cranial de cadela com neoplasia mamária.

Após procedia-se com a antissepsia da paciente e colocação dos campos operatórios. O tempo entre a aplicação do corante e a retirada do linfonodo foi de aproximadamente 10 minutos. Realizou-se incisão de 3 cm na região axilar e divulsão delicada do tecido subcutâneo para remoção do linfonodo (Figura 3). Nesse momento foi avaliado se o corante penetrou no linfonodo. Em seguida reduzia-se o subcutâneo com fio absorvível 3-0 em padrão contínuo e sutura de pele foi feita com mononáilon 3-0 ou 4-0 em padrão simples isolado.

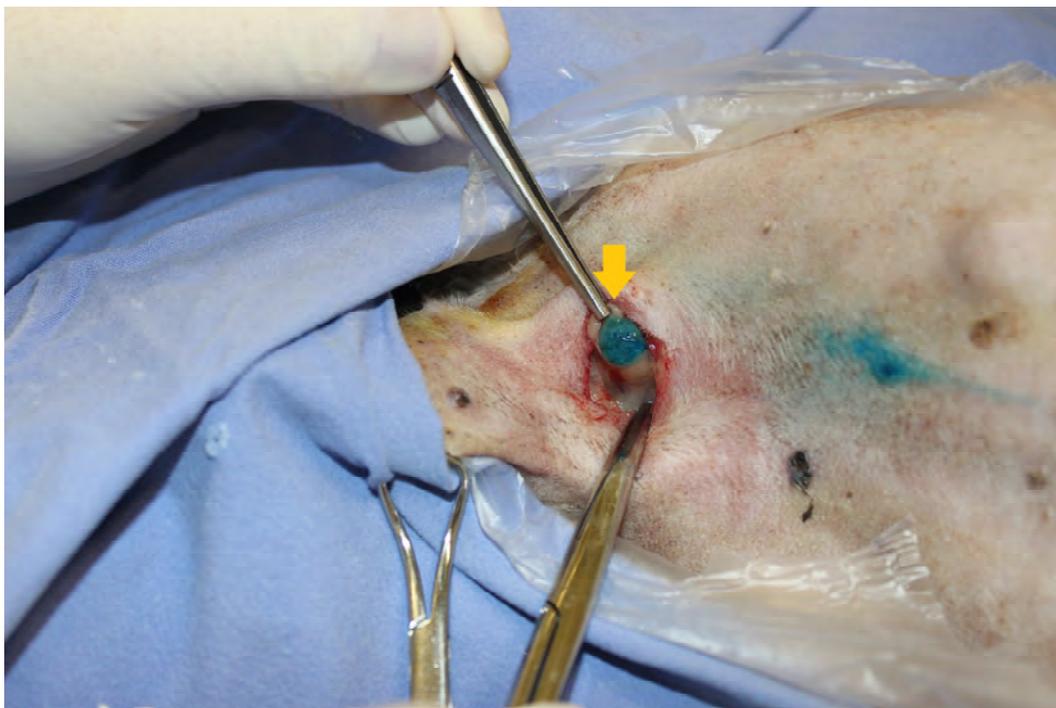


Figura 3. Retirada de linfonodo axilar (seta laranja) em uma cadela com tumor de mama impregnado com corante azul patente 2,5%, o qual foi aplicado em mama torácica cranial por via intradérmica.

Após foi realizada a mastectomia unilateral total com uma incisão em elipse em torno da cadeia mamária acometida, com pelo menos 2 cm de margem cirúrgica do tumor. Foi realizada divulsão da cadeia mamária e tecido subcutâneo para remoção da cadeia mamária, iniciando-se sempre pela mama inguinal, progredindo para as mamas craniais. Os vasos foram ligados com fio absorvível (ácido poliglicólico) 3-0. O linfonodo inguinal foi removido juntamente como a mama inguinal. Posteriormente foi realizada lavagem do leito cirúrgico com aproximadamente 100 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. A redução do espaço morto para aproximação das margens da lesão cirúrgica foi realizada em duas etapas: a primeira com fio ácido poliglicólico 2-0 e pontos simples isolados e a segunda com fio 3-0 em padrão simples contínuo. A sutura da pele foi feita com fio mononáilon 3-0 ou 4-0 em padrão isolado simples. Houve variação da espessura do fio de acordo com o tamanho e espessura da pele do animal.

4.6 Cuidados pós-operatórios imediatos com os animais

Após o procedimento os animais receberam cloridrato de tramadol 4 mg/kg e dipirona sódica 25 mg/kg por via intramuscular. A analgesia foi modificada de acordo

com a necessidade do animal. Como anti-inflamatório foi administrado meloxicam 0,2 mg/kg também por via intramuscular.

O curativo da ferida cirúrgica foi procedido com gaze fixada à fita micropore com auxílio de tintura de benjoim e atadura compressiva em toda a cicatriz cirúrgica e após feita a colocação de malha tubular. As pacientes foram observados por pelo menos 5 horas após final do procedimento e só após esse período recebiam alta.

Para administração em domicílio foi prescrito meloxicam 0,1 mg/kg SID por dois dias, enrofloxacin 2,5 mg/kg BID por 10 dias, cloridrato de tramadol 5 mg/kg TID por 4 dias e dipirona sódica 25 mg/kg por 4 dias. Além disso, foram feitas recomendações sobre limpeza da ferida com solução fisiológica duas vezes ao dia, manter com atadura compressiva por pelo menos 2 dias e uso obrigatório de colar elisabetano ou roupa cirúrgica. Quando necessário os tutores entraram em contato para relatar sinal de dor ou alteração na ferida cirúrgica e então o protocolo de medicamentos ou curativos foi reajustado mediante revisão clínica da paciente. Após 14 dias foi realizada revisão clínica e retirada de pontos das pacientes. Nesse momento foi transmitido resultado do laudo histopatológico e as instruções sobre tratamento adjuvante, quando necessário.

Nos casos de tipos histológicos específicos, metástase em linfonodo ou evidência de margem comprometida pela histopatologia, foi indicada realização de quimioterapia como tratamento adjuvante.

4.7 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

As amostras (cadeia mamária e linfonodos) coletadas durante o procedimento cirúrgico foram imersas em solução de formalina a 10% em frascos devidamente identificados e encaminhadas imediatamente ao Setor de Patologia da Faculdade de Veterinária. Após 24 horas foram processadas pela técnica rotineira de inclusão em bloco de parafina, do qual obteve-se corte histológico para coloração de hematoxilina-eosina (HE). Os tumores foram classificados conforme classificação proposta por Goldschmidt et al. (2011).

As lâminas confeccionadas a partir dos blocos de parafina dos linfonodos inguinal e axilar de cada paciente foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica (IHQ) com o anticorpo monoclonal citoqueratina (AE1/AE3) para detecção de células epiteliais metastáticas (ANEXO 3). Linfonodos foram determinados positivos pela IHQ quando houve marcação de células epiteliais evidenciadas pela cor marrom. Todas as

lâminas dos tumores primários e dos linfonodos foram avaliadas pelo mesmo patologista.

4.9 Análise estatística

Para análise estatística, os dados foram digitados no programa WINPEPI para Windows. A correlação entre ocorrência de metástase e micrometástase e glândula mamária acometida foi realizada pelo teste exato de Fisher.

5 RESULTADOS

5.1 Técnica de coloração com azul patente

O corante migrou pelos vasos linfáticos e corou o linfonodo axilar, o qual foi facilmente localizado e removido cirurgicamente após estar impregnado pelo corante. O fato de o linfonodo estar de coloração azulada permitiu que uma incisão pequena fosse feita, além de menor manipulação da região visto que o linfonodo estava evidente na região. Apenas duas pacientes das 49 não tiveram o linfonodo corado pois já havia grande quantidade de células tumorais, ocasionando alteração bem evidente de consistência e formato, além de diminuição da mobilidade (Figura 4). O corante apresentou eficácia na coloração em 95,9% das pacientes.



Figura 4. Linfonodo axilar palpável de cadela com tumor de mama palpável em avaliação pré-cirúrgica, no período trans cirúrgico não apresentou qualquer absorção do corante. O mesmo apresentava-se firme e aderido na região axilar (observar interior do círculo laranja).

Durante o procedimento a maior parte do corante ficava disperso na região da mama torácica cranial espalhando-se em mama, musculatura e pele. Como essa região

era removida durante a mastectomia, a absorção sistêmica foi pequena. A impregnação pode ser explicada pela aplicação do corante em um único ponto, gerando acúmulo do corante no local.

Duas pacientes da raça poodle mostraram coloração da pele em tom azulado de forma difusa, sinal clínico observado pelos tutores por no máximo 24 horas após o procedimento cirúrgico. Uma cadela da raça cocker spaniel apresentou fezes de coloração azul/esverdeada três dias após o procedimento cirúrgico. Todas as cadelas eliminaram o corante pela urina, o que foi identificado por meio da sonda uretral (urina azul ou verde) e em até um dia após o procedimento, pelos tutores em suas casas. Nenhuma paciente apresentou qualquer tipo de reação alérgica como pápulas, eritema, placas azuladas na pele, vômitos ou diarreia.

5.2 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos linfonodos

Das 50 pacientes submetidas à mastectomia unilateral total, uma teve que ser excluída por apresentar hiperplasia mamária cística, a qual havia tido exame citológico da mama sugestivo de carcinoma.

No total, 49 pacientes tiveram a cadeia mamária e linfonodo(s) avaliados por histopatologia com a coloração de hematoxilina-eosina (Figura 5) e imuno-histoquímica com anticorpo citoqueratina (AE1/AE3) (Figura 6).

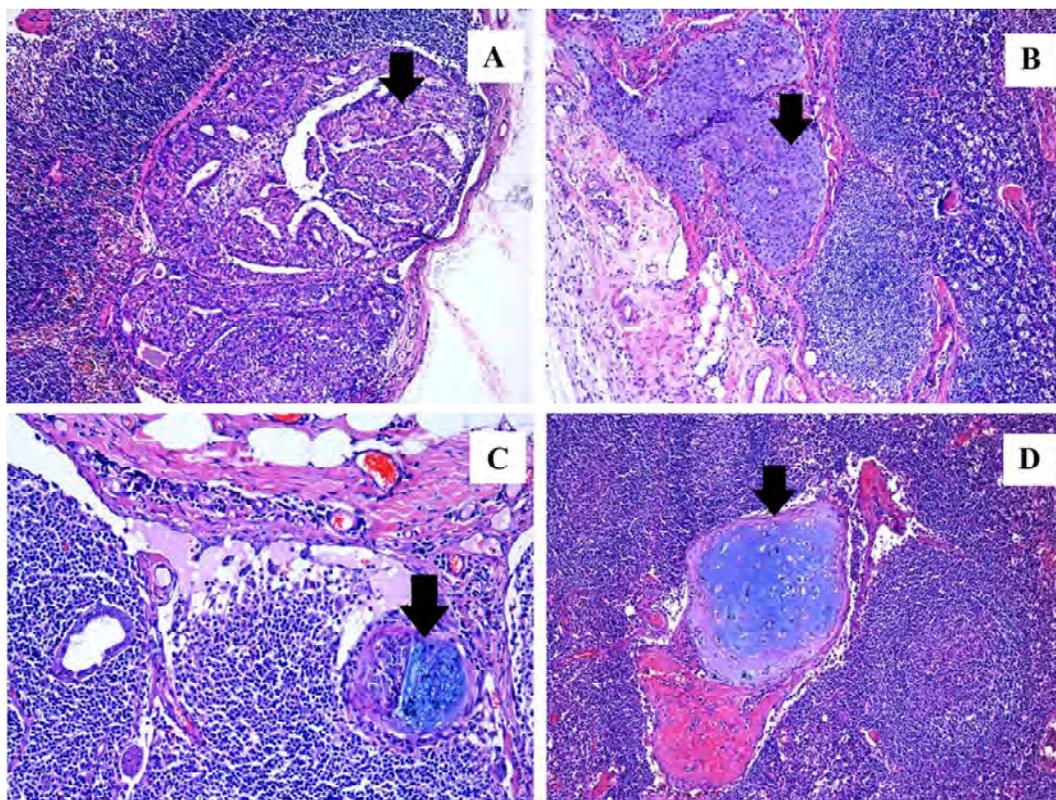


Figura 5. Amostras de linfonodos de cadelas com neoplasia mamária de cadelas submetidas a coloração de hematoxilina-eosina, os quais apresentaram presença de células tumorais apontado pelas setas pretas. A: carcinoma tubulo-papilar; B: carcinoma sólido; C e D: carcinosarcoma.

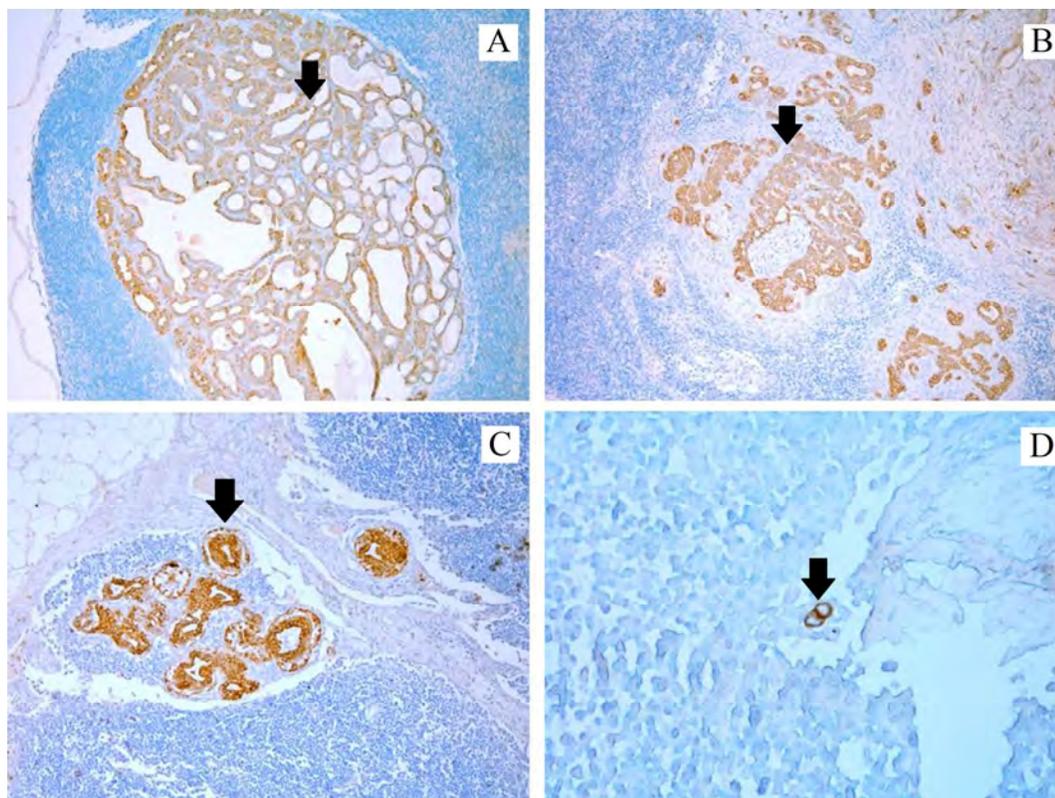


Figura 6. Linfonodos de cadelas com tumor de mama após técnica de imuno-histoquímica com anticorpo citoqueratina revelando células epiteliais (coradas de marrom, apontadas pelas setas pretas). A: carcinoma tubulo-papilar; B: carcinoma e mioepitelioma maligno; C: carcinoma e mioepitelioma maligno com as células localizadas na região subcapsular; D: carcinosarcoma apresentando-se como células epiteliais isoladas.

De todas as cadelas incluídas no estudo, oito das 49 apresentaram linfonodo axilar positivo, sendo uma somente na imuno-histoquímica e sete detectadas por histopatologia e também por imuno-histoquímica (Tabela 2). Uma paciente que apresentava tumor em mamas abdominal caudal e inguinal tinha metástase no linfonodo axilar e inguinal (APÊNDICE B).

Os tipos histológicos mais frequentes foram o carcinoma em tumor misto (12 casos) e o carcinoma complexo (11 casos). Somente um animal apresentou tumor benigno (adenoma de glândula mamária).

A detecção de micrometástase pela imuno-histoquímica ocorreu em duas pacientes sendo uma em linfonodo axilar e outra em inguinal (Apêndice B). As células coradas tinham morfologia epitelial e estavam isoladas ou em duplas.

Considerando as 49 pacientes incluídas no estudo, o que gerou a análise de 245 mamas (5 por cadela), foi realizada uma correlação entre mama acometida e percentual

de nódulos com metástase (Tabela 2). Foi observado que na mama torácica cranial (M1) de 11 nódulos observados, 4 (36,4%) apresentaram metástase. Foi comparado pelo teste Exato de Fisher o percentual de nódulos com metástase da M1 com o percentual nas outras mamas e vemos que essa se destaca por ter uma maior quantidade de nódulos com metástase quando comparada com as outras ($P=0,011$). As outras mamas (M2 a M5) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 2. Análise estatística da correlação de ocorrência de metástase no linfonodo axilar e mama acometida pelo tumor. * Valor P obtido pelo teste Exato de Fisher

| Mama acometida | Número de nódulos por mama | Número de linfonodos axilares com metástase | % de nódulos com metástase | P* |
|------------------------|----------------------------|---|----------------------------|-------|
| Mama torácica cranial | 11 (13,93%) | 4 | 4/11=36,4% | 0,011 |
| Mama torácica caudal | 10 (12,66%) | 1 | 1/10=10,0% | 0,999 |
| Mama abdominal cranial | 14 (17,72%) | 2 | 2/14=14,3% | 0,626 |
| Mama abdominal caudal | 20 (25,31%) | 1 | 1/20=5% | 0,672 |
| Mama inguinal | 24 (30,38%) | 0 | 0/24=0% | 0,098 |
| Total | 79 | 8 | 8/79=10,1% | |

5.3 Estadiamento tumoral

O TNM (estadiamento tumoral) considera o tamanho do tumor, metástase em linfonodo seja por citologia ou histopatologia e também presença de metástase a distância. As pacientes com metástase em linfonodo foram classificadas como N1, T variou conforme tamanho dos nódulos mamários. Nenhuma paciente se enquadrou na classificação M1 pois metástase a distância era fator de exclusão do estudo.

Das 49 pacientes incluídas no estudo, 20 (40,82%) apresentaram tumores menores do que 3 cm, 7 (14,28%) tumores entre 3 e 5 cm e 22 (44,90%) tumores maiores ou iguais a 5 cm. Entre as que apresentaram metástase no linfonodo axilar, 50% tinham tumor maior do que 5 cm. (Tabela 3)

Tabela 3. Pacientes submetidas a mastectomia que apresentavam metástase em linfonodo axilar, relacionando tipo histológico e estadiamento tumoral.

| N da paciente no estudo | Tamanhos do maior nódulo | Estadiamento |
|----------------------------|--------------------------|--------------|
| 1 | 7 cm | T3N1M0 |
| 2 | 3 cm | T2N1M0 |
| 5 | 9 cm | T3N1M0 |
| 8 | 10 cm | T3N1M0 |
| 19 | 2,5 cm | T1N1M0 |
| 32 | 4 cm | T2N1M0 |
| 37 | 1 cm | T1N1M0 |
| 47 | 8 cm | T3N1M0 |

5.4 Avaliação pós-operatória da região axilar

De todas as 49 pacientes incluídas no estudo, apenas uma cadela (2%) apresentou seroma na região axilar no período pós-operatório. A cadela era da raça pitbull, e apresentava nódulo somente em mama abdominal caudal. Durante o procedimento foi observado que o linfonodo axilar da paciente encontrava-se muito profundo, e, apesar da coloração com o azul patente facilitar sua localização, a retirada foi difícil pelo posicionamento do mesmo, tornando necessária maior manipulação da região.

As demais pacientes não apresentaram complicações na ferida cirúrgica como deiscência de pontos, edema ou seroma. Nenhuma paciente apresentou desconforto na região axilar e claudicação do membro torácico ipsilateral.

Em nenhum dos casos foi necessária modificação de protocolo de medicações no pós-operatório. Casos de deiscência de sutura da mastectomia ocorreram somente em cadelas (4) que por algum motivo ficaram sem proteção como colar elisabetano ou roupa cirúrgica pós-operatória. Essas pacientes removeram alguns dos pontos e lamberam a ferida cirúrgica, fato relatado pelos tutores. Nenhuma cadela apresentou desconforto ou prurido na região da cicatriz axilar.

6 DISCUSSÃO

A amostragem desse estudo foi realizada por conveniência, incluindo pacientes oriundos da rotina clínica do Hospital Clínicas Veterinárias da UFRGS (HCV-FAVET-UFRGS) com indicação médica para a realização do procedimento de mastectomia. Portanto, o número amostral foi estimado de acordo com os dados referentes ao histórico de atendimento do Setor de Oncologia do HCV-FAVET-UFRGS. A quantidade de pacientes também foi baseada em trabalho similar realizado com gatas na França para pesquisa de drenagem linfática da cadeia mamária, o qual utilizou 50 gatas (RAHARISON & SAUTET, 2006).

Todas as cadelas realizaram exames pré-cirúrgicos para correto estadiamento tumoral, o que permitiu que oito delas fossem excluídas por presença de metástase a distância, o que ressalta a importância da realização desses exames, assim como cita Sonremo et al. (2013). As pacientes que puderam ser incluídas foram submetidas a minucioso exame clínico dos linfonodos pela palpação. O fato de apenas duas pacientes apresentarem linfonodo palpável, mostra que a histopatologia não condiz com a avaliação clínica (7 pacientes com linfonodo positivo pela HE). Foi possível observar que cadelas de raças grandes possuem esse linfonodo com acesso mais difícil e independente da raça ou porte, apesar de não haverem estudos demonstrando variação entre raças e conformidade da caixa torácica. Sugere-se que em casos de ocorrência de metástases iniciais ou micrometástases, essas alterações não seria suficiente para alterar a consistência e o tamanho desse linfonodo, pois linfonodos clinicamente negativos não significam que não tenham metástase na histopatologia (JARAMILO et al., 2012).

A via linfática é considerada a mais importante rota de disseminação da metástase de tumor de mama em cadelas e que tumores que induzem formação de novos vasos linfáticos tem um alto poder metastático (JARAMILO et al., 2012), Por isso esse estudo foi focado no interesse de avaliar o percentual de metástase em linfonodo axilar em cadelas submetidas a mastectomia, devido ao fato de o mesmo raramente ser retirado, exceto em caso de alteração na palpação (TUOHY et al., 2009). A definição da técnica cirúrgica de mastectomia unilateral total foi baseada no estudo de Stratmann (2008) o qual mostrou que quando realizada mastectomia regional, ainda resta 58% de chance de recidiva tumoral no restante da cadeia mamária ipsilateral.

Para facilitar a retirada do linfonodo axilar, foi utilizada a técnica de coloração com azul patente por via intradérmica, a qual se mostrou de fácil execução devido ao

fato de ser aplicado com a paciente anestesiado. A via subcutânea da região periareolar é de fácil manipulação, o que tornou a aplicação simples e tempo entre a aplicação do corante e a retirada do linfonodo (10 minutos) se mostrou satisfatório, o que corrobora com o estudo de Campos et al. (2007). Os linfonodos axilares se apresentaram devidamente corado em 95,9% das pacientes, valor superior ao observado em outro estudo (PINHEIRO et al., 2003). O local de aplicação do corante obteve uma coloração azulada difusa devido a disseminação do mesmo e à incapacidade dos vasos linfáticos de absorverem todo o conteúdo, o que sugere que mais estudos sejam feitos avaliando dose desse corante.

Dois linfonodos que apresentavam metástase pela hematoxilina e eosina não apresentaram infiltração do corante, fato que poderia ser explicado pela literatura visto que um estudo realizado em mulheres conseguiu demonstrar que êmbolos tumorais atingem o LNS ao longo dos diferentes canais linfáticos, migram para a cápsula e em seguida, para o seio subcapsular, após infiltram os sinusóides e, em seguida, o parênquima do linfonodo, difusamente (ALVARENGA et al., 2013). Ou seja, sugere-se que os vasos linfáticos com êmbolos tumorais podem ter criado uma barreira mecânica impedindo que o corante percorresse seu interior. Aumento da dose provavelmente não seria eficaz se houver bloqueio mecânico dos vasos linfáticos. Esses linfonodos alterados em mobilidade, consistência e tamanho apresentaram pior prognóstico, visto que as pacientes relatadas foram a óbito em pouco tempo do procedimento cirúrgico. O presente estudo não tinha como objetivo avaliar a sobrevida livre de doença e nem a sobrevida global dessas pacientes, apesar de observado que a literatura é carente quanto a esses dados, visto que em mulheres há muitos trabalhos correlacionando a presença de metástase em linfonodo sentinela com esses tempos.

O uso do corante apresentou reação cutânea em apenas duas das 49 pacientes, sendo os dois de pele clara e da raça poodle. Em um estudo realizado por Souza et al.(2014) com 15 cadelas que receberam o corante azul de metileno a 1% e verde de indocianina a 1%, observou-se em todas as cadelas reações de hipersensibilidade cutânea ao uso dos corantes, mas uma possível explicação para isso é que a região que recebeu a aplicação e onde concentrou-se maior quantidade de corante não foi excisada, ao contrário desse estudo. Foi observado que todas as pacientes eliminaram corante pela urina no trans e pós-cirúrgico e apenas um tutor relatou que sua cadela apresentou fezes azuis-esverdeadas dois dias após a cirurgia. O corante se mostrou eficaz para identificação do linfonodo sem causar morbidade pois não foram observados sinais

clínicos que interferissem na qualidade de vida da paciente, assim como avaliado em outros estudos (PINHEIRO et al., 2003).

No presente estudo, 11 (22,45%) cadelas apresentaram metástase em linfonodo, sendo oito (16,33%) somente em linfonodo axilar, 3 em linfonodo inguinal e 2 cadelas em ambos. Outro trabalho também realizado com análise desses linfonodos mostrou que 30% das cadelas com tumores mamários malignos apresentavam metástase em linfonodo e 16,6% em pulmões (JARAMILO et al., 2012). Foi observado maior número de linfonodos axilares com metástase (8/49) do que de inguinal (5/49) apesar de a neoplasia em mamas caudais ter sido mais frequente. Com relação ao total de cadelas submetidas à avaliação para participar do estudo, 8 de 58 (13,79%) apresentaram nódulos pulmonares, índice abaixo da metástase em linfonodo, considerando ainda que as 8 pacientes não incluídas no experimento não tiveram seus linfonodos avaliados e não entraram na avaliação final.

Uma cadela com neoplasia em mama abdominal caudal apresentou metástase nos linfonodos axilar e inguinal. Considerando que essa mama é encontrada próxima ao linfonodo inguinal superficial, não seria indicada a retirada do linfonodo axilar para estadiamento. Entretanto, um estudo realizado por Pereira et al. (2003) relataram que em cadelas saudáveis essa mama drena exclusivamente para o linfonodo inguinal superficial, mas em animais com neoplasia mamária pode ser encontrada também comunicação da mesma com o linfonodo axilar, o que facilitaria a ocorrência de metástase para cabeça, pescoço e tórax. Assim como descrito por Pereira et al. (2003) e Patsikas et al. (2006), esse estudo não apresentou pacientes com tumores somente em glândulas mamária inguinal com metástase em linfonodo axilar, mas sugere-se que estudos com maior número de animais sejam feitos para que seja possível determinar se realmente não ocorre essa comunicação.

A imuno-histoquímica demonstrou ser um método válido pois todas as pacientes com metástase diagnosticadas na histopatologia tiveram o resultado confirmado pela presença de células epiteliais no linfonodo através da marcação com o anticorpo citoqueratina, além de mais duas que revelaram ter metástase somente pelo método de imuno-histoquímica (uma em inguinal e uma em axilar). Estudos mostram que a imuno-histoquímica é uma importante ferramenta em patologia mamária para pesquisa de micrometástases em linfonodo sentinela (SALLES et al., 2009; SONREMO et al., 2011). A literatura relata taxas de detecção de micrometástases em 7% a 42% em linfonodos axilares de mulheres, dependendo do método de estudo empregado e que

aproximadamente 25% das pacientes linfonodo-negativas desenvolverão recidiva da doença. Acredita-se que a recorrência seria devido às metástases que não foram detectadas pelos métodos de rotina e cujos pacientes foram subestadiados (SALLES et al., 2009), o que poderia ser extrapolado para pequenos animais, visto que duas pacientes só tiveram a metástase diagnosticada pela imuno-histoquímica. Apesar da alta sensibilidade encontrada, a utilização exclusiva da coloração rotineira de hematoxilina e eosina pode dificultar a identificação de células metastáticas isoladas, conduzindo a diagnósticos falso-negativos (PIATO et al., 2008; BESERRA, 2014).

A escolha do anticorpo foi baseada em trabalhos realizados com análise de linfonodos em mulheres com câncer de mama, sendo de rotina a realização da técnica com citoqueratina, para procura de células epiteliais metastáticas (SALLES et al., 2009). Visto que em linfonodo saudável não há a presença de células epiteliais, a marcação das mesmas torna clara a presença de metástase.

A correlação da ocorrência de metástase em linfonodo axilar considerando o intervalo de confiança 95% só foi significativa na mama torácica cranial (M1), a qual das 11 cadelas com neoplasia nessa mama, 4 foram positivas. Isso corresponde a 36,4% apresentando metástase. O teste exato de Fisher mostrou que a mama torácica cranial se destaca estatisticamente em relação à ocorrência de metástase, ou seja, a mama mais próxima do linfonodo axilar foi a com maior índice de metástases. Isso poderia sugerir que as mamas torácicas craniais são mais propensas a desenvolver metástase no linfonodo axilar, devido a sua localização, mas também sugere que neoplasias nessa mama tendem a ser mais agressivas, já que as demais que apresentaram número semelhante de tumores não causaram metástase em tantos animais e o valor não foi estatisticamente significativo. Com os resultados obtidos foi possível observar que o linfonodo axilar, que na maioria das vezes não é retirado apresentou taxa muito maior de metástase do que o linfonodo inguinal, o qual usualmente é removido junto a mama inguinal.

A mama inguinal foi a que mais apresentou nódulos (32,65% dos tumores estavam nessa mama) e apesar disso não foram encontrados muitos casos de metástase em linfonodo inguinal (3 no total), e desses, todos tinham tumor na mama anteriormente citada. O fato da glândula mamária inguinal apresentar maior número de nódulos condiz com a literatura que explica que, por essa glândula geralmente ser a maior de todas da cadeia mamária, conseqüentemente possui maior suprimento sanguíneo e drenagem linfática (JARAMILO et al., 2012). Como se trata de uma análise secundária,

seria necessário um número de pacientes maior para ter um resultado mais confiável, pois não há como prever a positividade de metástase e o cálculo amostral foi realizado conforme o que a rotina clínica e cirúrgica permitia.

Com relação ao estadiamento tumoral, todas as cadelas apresentaram graduação M0, já que metástase a distância era fator de exclusão do projeto, portanto nenhuma com estadiamento 5 foi incluída. O grau N então abrangeu a metástase por histopatologia ou imuno-histoquímica. Quanto ao T que se refere ao tamanho do tumor, 20 cadelas apresentaram tumor maior que 5 centímetros de diâmetro, variando entre 5 e 13 centímetros, o que mostrou que a maior parte dos tumores (44,90%) apresentavam mais do que 5 centímetros de diâmetro. Isso demonstra que nesse hospital casos já avançados de neoplasia mamária são atendidos, o que predispõe a ocorrência de metástase (CASSALI et al., 2014).

De todas as pacientes, a maioria (62,5%) que apresentou metástase em linfonodo axilar tinha nódulos maiores que 3 cm de diâmetro, e 4/8 (50%) maiores que 5 cm. Isso poderia interferir na ocorrência da metástase em linfonodo visto que os estudos mostram que tumores maiores de 3 cm de diâmetro já se tornam fator prognóstico por si só, indicando prognóstico ruim na evolução do quadro da paciente (SONREMO et al., 2013).

Com relação à morbidade axilar, a única paciente que apresentou seroma na região axilar não foi submetida a drenagem por ser pequena a quantidade de líquido, fato observado por avaliação clínica e ultrassonografia da região em avaliação pós-operatória. O seroma pode ter ocorrido devido localização profunda do linfonodo axilar e mesmo com a coloração facilitando a localização do mesmo, foi difícil a remoção do mesmo, o que gerou maior manipulação cirúrgica. Além disso, o temperamento também pode ter influenciado pois a cadela era agitada e ágil, não foi possível um repouso adequado. Esse caso foi o único das 49 pacientes, fato que não condiz com artigos referentes a mulheres com câncer de mama submetidas à técnica de esvaziamento axilar, nas quais quando todos os linfonodos presentes na axila são retirados geralmente é observada alta morbidade. É comum a ocorrência de dor, linfedema, linfangite e redução da mobilidade do braço após o procedimento (TUOHY et al., 2009). Esse fato poderia ser explicado pela falta de mobilidade dos membros torácicos dos cães, que não possuem abdução como em mulheres. Essa movimentação pode ser a causa de maior ocorrência de espaço morto e conseqüentemente formação de edema, seroma e dor.

Assim como observado nesse estudo, suposições quanto à drenagem linfática com base unicamente na proximidade do tumor primário com o linfonodo nem sempre estão corretas (TUOHY et al., 2009) e o conhecimento da drenagem linfática de glândulas mamárias de cadelas com neoplasia é muito importante para o cirurgião não só para realizar a técnica cirúrgica mais adequada, mas também para a determinação de um prognóstico pós-cirúrgico preciso (PATSIKAS et al., 2006). Baseado nesses fatos, sugere-se que sejam feitos estudos correlacionando a presença de metástase e micrometástase com a sobrevida de cadelas portadoras de câncer de mama para que o fator prognóstico seja melhor estabelecido.

Devido aos resultados do presente estudo, sugere-se que os linfonodos axilares sempre sejam retirados para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica visto que, mamas que fisiologicamente não tem comunicação com esse gânglio podem ocasionar metástase no mesmo, fato explicado pela linfangiogênese tumoral.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados nesse estudo, pode-se concluir que:

- O corante azul patente facilita a localização do linfonodo, diminuindo a manipulação e conseqüentemente a morbidade da região axilar.
- A avaliação histopatológica do linfonodo foi essencial para determinar se havia ou não presença de metástase e a análise imuno-histoquímica revelou ser muito útil na identificação de micrometástases de origem epitelial, as quais não puderam ser detectadas na técnica de hematoxilina-eosina.
- A morbidade axilar foi baixa, ocorrendo seroma em apenas uma paciente.
- Tumores em mamas torácicas craniais se mostraram estatisticamente propensos à maior ocorrência de metástase no linfonodo axilar quando comparados a nódulos em outras mamas.
- O tumor pode causar alteração na drenagem linfática provocando metástase em linfonodos que normalmente não drenam determinadas mamas.

REFERENCIAS

ALVARENGA, C.A. *et al.* Localization of metastasis within the sentinel lymph node biopsies: a predictor of additional axillary spread of breast cancer? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** v.35, n.11, Rio de Janeiro Nov. 2013.

BESERRA, H.E.O. **Metástases de carcinoma de mama em cadelas: avaliação da técnica de linfonodo sentinela.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). 62 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 2014.

BUITRAGO, F.; UEMURA, G.; SENA, M.C.F. Fatores prognósticos em câncer de mama/ Prognostic factors in breast cancer. **Comunicação em Ciências da Saúde (Impresso)**, v.22, p. 69-81, 2011.

CAMPOS, M.L.C., *et al.* Pesquisa do linfonodo sentinela (LNS) através da administração de corante azul de metileno em cães portadores de neoplasias. **Revista Nosso Clínico**. v.56, n.10, p.18-34, 2007.

CASSALI *et al.*; Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, n.2, p. 38-69, 2014.

CHENG, Y.; KUO, S.; CHEN D. Sparing sentinel node biopsy through axillary lymph node fine needle aspiration in primary breast cancers. **World Journal of Surgical Oncology**, v.11, p. 296, 2013.

EL KHATIB, E.M. *et al.* Uso do azul de metileno na identificação do linfonodo sentinela em cadelas com neoplasias mamárias. **Veterinária e zootecnia**. v.18, n.2, p. 1-171, 2011.

GOLDSCHMIDT, M. *et al.* Classification and Grading of Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p.117, 2011.

HARDIE, R.J.; PETRUS, D.J. Linfáticos e linfonodos. In: **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3ª Edição, Editora Manole, São Paulo, 2007.

JARAMILO, B.G.; ROJAS, M.C.R.; ESTRADA, J.G.M. Presence of lung metastases in bitches affected by malignant mammary neoplasms in Medellin (Colombia). **Revista MVZ Córdoba**. v.17, n.2, p.2983-2990, 2012.

MARINHO, V.F.Z. *et al.* Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira** v.54, n.3, p. 203-207. 2008.

MATHELIN, C. *et al.* Methylene blue dye, an accurate dye for sentinel lymph node identification in early breast cancer. **Anticancer Research**. v. 29, n.10, p. 4119-25. Out. 2009.

MATOS, A.J.F., *et al.* Detection of lymph node micrometastases in malignant mammary tumors in dogs by cytokeratin immunostaining. **Veterinary Research**, v. 158, p. 626-30. 2006.

MURPHY S. Mammary tumors in dogs and cats. In practice, v.30, p. 334-339, 2008.

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

PAZ, W.A.; PAIM, S.P.; MELLO, G.L. Biópsia de linfonodo sentinela – experiência clínica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.3, p. 303-308, 2001.

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, p. 282–290, 2003.

PIATO, J.R.M. *et al.* Metástase oculta em linfonodo sentinela no câncer de mama em estádios iniciais. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.9, p.432-436, 2008.

RAHARISON, F., SAUTET, J. Lymph Drainage of the Mammary Glands in Female Cats. **Journal of morphology**. v.267, n.3, pag 292-299, march 2006.

SALLES, M.A., *et al.* Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**. v. 45, n.3, p. 213-222, junho 2009.

SLEECKX, N. *et al.* Lymphangiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. **Journal of Comparative Pathology**. v. 150, p. 1-10, 2013.

SORENMO, K. U. *et al.* Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.48, n.1, p. 85-97, 2011.

SORENMO, K.U., WORLEY, D.R.; GOLDSCHMIDT, M.H. Tumors of the mammary gland. In: WITHROW S J, VAIL D M & PAGE R L. **Small Animal Clinical Oncology**. 5a ed. Editora Elsevier, 2013, p.538-556.

SOUZA, F.W. **Linfadenectomia inguinoilíaca videolaparoscópica em cadelas após impregnação com diferentes marcadores linfáticos**. 2014. 62 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

STAN, F. *et al.* Identifying the lymphatic vascular model of the mammary gland in bitches. **Lucrări Stiinifice Medicină Veterinară**. v. Xliii, n.2, Timișoara, p. 356, 2010.

STRATMANN, N., FAILING, K., RICHTER, A., *et al.* Mammary tumor recurrence in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary surgery**, v.37, n.1, p. 82-86. 2008.

SWAIN, S.F. Enxertos cutâneos. In: **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 2 Volumes. 3ª Ed. 2007. 2806 pag.

TUOHY, J.L. *et al.* A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. **Veterinary and Comparative Oncology**. v.7, n.2, p. 81–91, 2009.

TERRA, E.M.; VARALLO, G.R. Oncologia - Neoplasias mamárias. In: ROZA M, *et al.* **Dia-a-dia – Tópicos selecionados em especialidades veterinárias**. Editora Medvep, 2013, 455-456.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S. Expressão dos filamentos intermediários no diagnóstico dos tumores mamários de cadelas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.6, 2002.

WILLIAMS, L.E.; PACKER, R.A. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.222, p. 1234–1236, 2003.

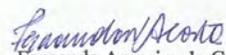
ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
HOSPITAL DE CLÍNICAS VETERINÁRIAS

TERMO DE CIÊNCIA E APROVAÇÃO

Venho por meio deste, informar que o trabalho intitulado “**Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total**” desenvolvido pela mestranda Simone Passos Bianchi, sob orientação do Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini, que envolve cães atendidos na rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS fica autorizado a ser realizado nas dependências desde hospital-escola veterinário, desde que atenda as normas internas do HCV, autorização dos proprietários assim como as determinações específicas da CEUA/UFRGS sobre o uso de animais.

Atenciosamente,


Fernanda Amorim da Costa

Vice-diretora do HCV-UFRGS

Porto Alegre, 28 de fevereiro de 2014.

ANEXO 2



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 26411

Título: Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

EMERSON ANTONIO CONTESINI - coordenador desde 01/04/2014
LUCIANA OLIVEIRA DE OLIVEIRA - pesquisador desde 01/04/2014
CRISTIANO GOMES - pesquisador desde 01/04/2014
SAULO PETINATTI PAVARINI - pesquisador desde 01/04/2014
DANIEL GUIMARÃES GERARDI - pesquisador desde 01/04/2014
Fabiane Reginatto dos Santos - pesquisador desde 01/04/2014
Leticia Mendes Fratini - Aluno de Mestrado desde 01/04/2014
Simone Passos Bianchi - Aluno de Mestrado desde 01/04/2014
Verônica Santos Mombach - Aluno de Mestrado desde 01/04/2014
Fernanda Soldatelli Valente - Aluno de Mestrado desde 01/04/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 07/04/2014 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 50 cães, fêmeas, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 23 de Abril de 2014

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

ANEXO 3**Técnica de imuno-histoquímica CITOQUERATINA AE1/AE3**

1. Xilol I e II;
2. Álcool 100%;
3. Álcool 96%;
4. Álcool 80%;
5. Álcool 70%;
6. Lavar com água destilada;
7. Bloqueio da peroxidase endógena: peróxido de hidrogênio 10% em solução de metanol por 15 minutos;
8. Lavar com água destilada;
9. Recuperação antigênica: tampão citrato, pH 6,0, por 3 minutos a 125°C na panela de pressão;
10. Lavar com água destilada;
11. Bloqueio de reações inespecíficas: leite desnatado 5% (diluir em PBS) por 30 minutos;
12. Lavar com água destilada;
13. Anticorpo primário monoclonal Cytoqueratin (clone AE1/AE3, Dako)
14. Lavar com água destilada;
15. Gotas amarelas (link universal biotilado, Kit LSAB-HRP) por 20 minutos em temperatura ambiente;
16. Lavar com água destilada;
17. Gotas vermelhas (streptavidina, Kit LSAB-HRP) por 20 minutos em temperatura ambiente;
18. Lavar com água destilada;
19. Revelação: cromógeno DAB líquido (1 ml do buffer solution + uma gota do cromógeno, a reação com tecido se faz muito rápido, aproximadamente 30 segundos. Pode-se fazer o tempo padrão baseado no controle;
20. Lavar com água destilada;
21. Contra corar com hematoxilina, aproximadamente 10 segundos;
22. Desidratar em álcool 80%, 96% e 100%;
23. Xilol III e IV;
24. Montar a lâmina.

APÊNDICE A



PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Dados de identificação**

Título do Projeto: Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total.

Pesquisador: Simone Passos Bianchi

Pesquisador Responsável: Dr. Emerson Antonio Contesini

Instituição: Faculdade de Veterinária da UFRGS

Nome do tutor do animal: _____

Telefones para contato: (____) _____ - (____) _____

R.G. _____ **CPF:** _____

Nome do animal _____ **Idade:** ____ **Raça:** _____

Nº da ficha no HCV: _____

Seu animal foi convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado: “Linfonodo axilar como sentinela nas neoplasias mamárias de cadelas submetidas à mastectomia unilateral total”. A participação no projeto de pesquisa não é obrigatória, a qualquer momento você pode desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo na relação do seu animal com o pesquisador ou com a instituição.

Os objetivos são verificar a presença de metástase em linfonodo axilar em pequenos animais com neoplasia mamária. O animal receberá aplicação de um corante com efeito temporário para facilitar a localização do linfonodo, o qual será removido para avaliação histopatológica. A paciente também será submetida a procedimento cirúrgico de mastectomia unilateral total da cadeia acometida pelo tumor.

A participação de sua cadela nessa pesquisa consistirá em fornecer linfonodo axilar correspondente a cadeia acometida pela neoplasia para estudo de fator prognóstico da doença. Para realização do procedimento o animal será anestesiado, estando sujeito aos riscos anestésicos. O animal será monitorado durante todo o

procedimento cirúrgico, através de eletrocardiograma, frequência cardíaca, frequência respiratória, oximetria e pressão arterial não invasiva.

O linfonodo e a cadeia mamária serão encaminhados para análise histopatológica, na qual será realizada classificação do tumor e avaliação da presença de metástase no linfonodo. O benefício relacionado à participação no projeto será a confirmação da presença ou ausência de metástase no linfonodo axilar, o que mudaria a técnica padrão de mastectomia em cadelas assim como proporcionará estudo sobre estadiamento e fator prognóstico nesses animais. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais, sendo assegurado o sigilo.

O projeto de pesquisa terá a duração de um ano (2014/2015). A qualquer momento, você poderá entrar em contato para sanar eventuais dúvidas sobre o projeto e/ou sobre a participação. Será entregue uma cópia deste termo, na qual consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador responsável.

Data, nome e assinatura do pesquisador

Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia. Porto Alegre/RS.

CEP: 91540-000. Telefone: 51 3308-6095

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da participação do meu animal na pesquisa e aprovo sua participação no projeto. Ao assinar esse termo também autorizo o registro fotográfico do animal.

Porto Alegre, _____ de _____ de 2014.

Nome e assinatura do tutor da cadela

APÊNDICE B

| Paciente | Raça | Metástase em linfonodo | Mama e tamanho tumoral | TNM | Tipo histológico |
|----------|------------|------------------------|----------------------------|--------|-----------------------------------|
| 1 | SRD | axilar (HE) | M3 7cm; M5 | T3N1M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |
| 2 | poodle | axilar (HE) | Todas 1 a 3 cm | T2N1M0 | Carcinossarcoma |
| 3 | SRD | | M5 3 cm | T1N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 4 | SRD | inguinal (HE) | M4 13cm; M5 | T3N1M0 | Carcinossarcoma |
| 5 | poodle | axilar e inguinal (HE) | M4 9cm; M5 | T3N1M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |
| 6 | galgo | | M5 2 cm | T1N0M0 | Carcinoma simples tubulo-papilar |
| 7 | SRD | | M1 10 cm (placa) | T3N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 8 | SRD | axilar (HE) | M1 10 cm; M4 3cm | T3N1M0 | Carcinoma sólido |
| 9 | SRD | | M2 3 cm; M4 0,5cm | T2N0M0 | Carcinoma sólido |
| 10 | SRD | | M5 6 cm + M3 1 cm | T3N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 11 | dachshund | | M5 1 cm | T1N0M0 | Carcinoma complexo |
| 12 | pitbull | | M4 1,5 cm | T1N0M0 | Carcinoma simples tubulopapilar |
| 13 | cocker | | M4 3 cm | T2N0M0 | Carcinoma complexo |
| 14 | chiuaua | | M4 7 cm+M3 0,5 cm | T3N0M0 | Carcinoma simples tubulopapilar |
| 15 | dálmata. | | M4 2,8 cm+M5 1 cm | T1N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 16 | poodle | | M3 6 cm | T3N0M0 | Carcinossarcoma |
| 17 | dachshund | | M1 1,5 cm+ M4 0,6 cm | T1N0M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |
| 18 | cocker | | M4 1,5 cm+ M3 1 cm | T1N0M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |
| 19 | SRD | axilar (IH) | M4 2,5 cm+ M2 2 cm (placa) | T1N1M0 | Carcinoma complexo |
| 20 | pitbull | | M5 3,5 cm | T3N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 21 | poodle | | M1 1,2 + M5 9cm | T3N0M0 | Carcinossarcoma |
| 22 | SRD | | M3 1 cm | T1N0M0 | Carcinoma complexo |
| 23 | poodle | | M4 0,4 cm | T1N0M0 | Carcinoma complexo |
| 24 | poodle | | M1 3 cm+ M2 2cm | T3N0M0 | Carcinoma complexo |
| 25 | rottweiler | | M5 8 cm | T3N0M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |

| Paciente | Raça | Metástase em linfonodo | Mama e tamanho tumoral (em cm) | TNM | Tipo histológico |
|----------|-----------------|------------------------|--------------------------------|--------|-----------------------------------|
| 26 | Cocker | | M5 1,3 cm | T1N0M0 | carcinossarcoma |
| 27 | Poodle | inguinal (IH) | M2 2 cm +M5 7 cm | T3N0M0 | carcinossarcoma |
| 28 | lhasa apso | | M3 3 cm + M4 1 cm | T2N0M0 | Carcinoma simples tubulopapilar |
| 29 | SRD | | M4 4 cm | T2N0M0 | Carcinoma em t. misto |
| 30 | poodle | | M5 9 cm | T3N0M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |
| 31 | yorkshire | | M2 0,5 + M5 0,3cm | T1N0M0 | Carcinoma complexo |
| 32 | Poodle | axilar (HE) | M1 4 cm + 2 cm | T2N1M0 | comedocarcinoma |
| 33 | rottweiler | | M3 9 cm | T3N0M0 | Carcinoma simples tubulo-papilar |
| 34 | poodle | | M2 0,6 cm | T1N0M0 | Carcinoma complexo |
| 35 | SRD | inguinal (HE) | M4 10 cm + M5 3,5 | T3N1M0 | carcinossarcoma |
| 36 | dachshund | | M1 0,5 cm +M2 1 cm +M3 1 cm | T1N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 37 | dachshund | axilar (HE) | M1 1 cm+ M5 1 cm | T1N1M0 | Carcinoma complexo |
| 38 | Pastor alemão | | M1 13 cm, M3 2 cm | T3N0M0 | Carcinoma complexo |
| 39 | pinscher | | M5 2 cm | T1N0M0 | Carcinoma complexo |
| 40 | poodle | | M2 5,5 cm | T3N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 41 | akita | | M5 6 cm, M4 2 cm, M3 placa | T3N0M0 | Carcinoma e mioepitelioma maligno |
| 42 | poodle | | M5 8 cm, M2 2,5 cm | T3N0M0 | carcinossarcoma |
| 43 | Fox paulistinha | | M4 0,4 cm, M5 1 cm | T1N0M0 | Adenoma de glândula mamária |
| 44 | poodle | | M4 3 cm, M3 1,5 cm | T3N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 45 | chiuaua | | M2 3 cm +2 cm | T2N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 46 | dachshund | | M1 1 cm, m3 1,5 cm | T1N0M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 47 | SRD | axilar e inguinal (HE) | M3 8 cm, M4 1 cm, M5 2 cm | T3N1M0 | Carcinoma em tumor misto |
| 48 | poodle | | M5 3,5 cm, m4 2 cm | T2N0M0 | Carcinoma simples tubulo-papilar |
| 49 | SRD | | M5 1 cm | T1N0M0 | Carcinoma simples tubulo-papilar |