

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DO LINFONODO SENTINELA EM TEMPO
REAL POR MEIO DO SISTEMA DE IMAGEM NO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) EM CÃES COM
NEOPLASMAS SÓLIDOS**

Jorge Luis Alvarez Gómez

Médico Veterinário

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MAPEAMENTO DO LINFONODO SENTINELA EM TEMPO
REAL POR MEIO DO SISTEMA DE IMAGEM NO
INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) EM CÃES COM
NEOPLASMAS SÓLIDOS**

Discente: Jorge Luis Alvarez Gómez

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Cirurgia
Veterinária.**

2020

A473m

Alvarez, Jorge Luis Gómez

Mapeamento do linfonodo sentinela em tempo real por meio do sistema de imagem no infravermelho próximo (NIR) em cães com neoplasmas sólidos / Jorge Luis Gómez Alvarez. -- Jaboticabal, 2020
63 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Andrigo Barboza De Nardi

1. Drenagem linfática. 2. Metástase. 3. Estadiamento do câncer. 4.
Oncologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MAPEAMENTO DO LINFONODO SENTINELA EM TEMPO REAL POR MEIO DO SISTEMA DE IMAGEM NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) EM CÃES COM NEOPLASMAS SÓLIDOS

AUTOR: JORGE LUIS ALVAREZ GÓMEZ

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Dra. SABRINA MARIN RODIGHIERI
Instituto Positivo / Curitiba/PR
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Prof. Dr. JORGE LUIZ COSTA CASTRO
Pontifícia Universidade Católica do Paraná / Curitiba/PR
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Prof. Dr. FABRICIO SINGARETTI DE OLIVEIRA
Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV - UNESP
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

Jaboticabal, 15 de abril de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jorge Luis Alvarez Gómez – nascido no dia 01 de janeiro de 1982, natural de Pillaro, Tungurahua – Equador. Graduado no curso de Medicina Veterinária na Universidade Técnica de Cotopaxi, no ano 2006. No período de 2007 a 2009 fez internato e residência em clínica cirúrgica no Hospital Veterinário para Pequenos Animais (HVPE-UAEM) na Universidade Estadual de México - UAEM – México. No período 2010 a 2012 foi diretor do Hospital Veterinário “All Pets” em Quito – Equador. Nesse mesmo período também foi professor das disciplinas de Cirurgia Geral, Diagnóstico Clínico e Tópicos Especiais na Escola de Medicina Veterinária, Universidade De Las Américas - UdlA, Quito - Equador. No período 2013 a 2015 foi Diretor da Clínica Veterinária Docente UdlA e professor de Cirurgia Geral na mesma universidade. No período de março de 2015 a julho de 2016 fez mestrado em Cirurgia Veterinária na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi. Posteriormente, foi aprovado no Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de doutorado, na mesma instituição tendo iniciado as atividades em julho de 2016. No período junho de 2015 a março de 2020 participou do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária e de Cirurgia Reconstructiva no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP de Jaboticabal.

“Impressiona-me a urgência por fazer. Saber não é suficiente; deve-se praticar.
Querer não é suficiente; deve-se agir.” Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

Para meus avós Georgina e Balerio, para meus pais Blanca Gómez e Blasco Alvarez, eles me ensinaram a importância dos valores: respeito, humildade, honestidade, tolerância, responsabilidade, solidariedade e trabalho, para assim manter um equilíbrio nos pilares fundamentais da minha vida. Para minha noiva, Nathalia Segovia, pelo amor e confiança durante toda esta trajetória no Brasil. Para meus irmãos Pedro, Daniel, María Fernanda e Lorena (cunhada) pelo apoio e amizade incondicional. Para meus sobrinhos Camila e Mateo, por serem uma fonte de constante aprendizado. A todos os cães e gatos que precisam de um médico veterinário para tratar as doenças que padecem.

AGRADECIMENTOS

Sem dúvida, conquistar esta meta pessoal na FCAV, Unesp, Câmpus de Jaboticabal não teria sido possível sem a ajuda e orientação do professor Andriago Barboza de Nardi. Serei sempre grato pela oportunidade oferecida.

A todas as pessoas que estiveram envolvidas nesta pesquisa, especialmente Ângelo Govone, Thiago Dreyer e Andriago Barboza de Nardi porque colaboraram para que uma ideia seja transformada em algo tangível e aplicado à rotina da cirurgia oncológica veterinária. Aos tutores dos cães que colaboraram nesta pesquisa. As residentes de obstetrícia e reprodução animal, aos residentes de clínica e cirurgia veterinária e aos pós-graduandos do setor de oncologia que me ajudaram com os pacientes. A contribuição de cada um de vocês foi essencial para a realização e conclusão deste trabalho. À CAPES pelo auxílio financeiro para a realização do doutorado.

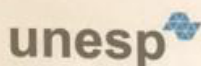
Finalmente, quero agradecer aos professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ao pessoal auxiliar e administrativo do Hospital Veterinário de Pequenos Animais “Governador Laudo Natel” que direta ou indiretamente contribuíram para minha aprendizagem.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp Câmpus de Jaboticabal, pela estrutura e suporte laboratorial.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
 CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	 1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1 Linfonodos.....	2
2.1.1 Vasos linfáticos.....	3
2.1. 2 Linfangiogênese.....	5
2.1.3 Linfonodo sentinela.....	6
2.2 Imagem no infravermelho próximo.....	11
2.2.1 Indocianina verde.....	13
 3. REFERÊNCIAS.....	 15
 CAPITULO 2 – Mapeamento do linfonodo sentinela em tempo real por meio do sistema de imagem no infravermelho próximo (NIR) em cães com neoplasmas sólidos.....	 25
RESUMO.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Material e métodos.....	28
2.3 Resultados.....	31
2.4 Discussão.....	39
2.5 Conclusão.....	42
2.6 Referências.....	43
 APÊNDICE.....	 49
Tabela 1A Localização anatômica dos linfonodos sentinelas em 30 cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários.....	50

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da margem cirúrgica e do linfonodo sentinela em tempo real através do sistema de imagem de infravermelho próximo (NIR) em cães com tumores sólidos**", protocolo nº 011029/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de agosto de 2018.

Vigência do Projeto	01/09/2018 a 23/12/2019
Espécie / Linhagem	<i>Canis lupus familiaris</i>
Nº de animais	30
Peso / Idade	Qualquer peso e idade
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel"

Jaboticabal, 06 de agosto de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 - www.fcav.unesp.br

MAPEAMENTO DO LINFONODO SENTINELA EM TEMPO REAL POR MEIO DO SISTEMA DE IMAGEM NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) EM CÃES COM NEOPLASMAS SÓLIDOS

RESUMO - A detecção e biopsia excisional seletiva do linfonodo sentinela em cães com neoplasmas malignos, que fazem metástase pela via linfática, tem importância para estabelecer o estadiamento da doença, determinar o prognóstico e definir o tratamento. Para a marcação e consequente detecção do linfonodo sentinela, em tempo real, foi utilizado indocianina verde (ICV) e foi desenvolvido um protótipo de imagem no infravermelho próximo. Participaram do estudo 30 cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários. No pré-operatório, em 25 cães (83%) houve demarcação fluorescente transcutânea do trajeto linfático subcutâneo desde o local da injeção (peritumoral) da ICV em direção de um linfocentro regional. Em dezesseis cães (53,3%), os linfonodos marcados com indocianina verde foram reconhecidos antes da incisão cutânea. No período intraoperatório, 29 cães tinham marcação fluorescente dos linfonodos sentinela. Em nove cães (30%), o linfonodo sentinela não estava localizado no linfocentro regional mais próximo do tumor. Em cinco cães, os neoplasmas drenaram simultaneamente para dois linfocentros diferentes. Dois linfonodos axilares com macrometástase de carcinoma mamário não apresentaram fluorescência. Em nenhum paciente foram observadas reações adversas decorrentes da injeção local de ICV. Frente aos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, pode-se concluir que a curva de aprendizagem para realizar o mapeamento e detecção do linfonodo sentinela durante o pré-cirúrgico e no intraoperatório por meio do protótipo de imagem NIR é simples, rápida e segura. Uma desvantagem do protótipo NIR é a sua capacidade reduzida para detectar os linfonodos sentinelas em regiões anatómicas relativamente profundas, porém é aplicável na rotina de cirurgia oncológica veterinária.

Palavras chave: linfocentro – linfadenectomia – indocianina verde – neoplasma mamário – neoplasmas cutâneos

MAPPING OF THE SENTINEL LYMPH NODE IN REAL TIME THROUGH NEAR – INFRARED (NIR) FLUORESCENCE IMAGING IN DOG’S SOLID NEOPLASMS

ABSTRACT - The detection and selective excisional biopsy of sentinel lymph node in dogs with malignant neoplasms, which produces metastasis via the lymphatic route, are important to define the disease status, determine the prognosis and choose the treatment. For marking and consequent detection of the sentinel lymph node, in real time, it was used green indocyanine (ICG) and developed an image prototype near infrared (NIR). Thirty dogs with cutaneous or breast malignant neoplasms participated in the study. In the preoperative period, 25 dogs (83%) presented transcutaneous fluorescent demarcation of the subcutaneous lymphatic path from the ICG injection site (peritumoral) towards a regional lymphocentrum. In sixteen dogs (53.3%), lymph nodes marked with green indocyanine were recognized before the skin incision. In the intraoperative period, 29 dogs had fluorescent marking of sentinel lymph nodes. In nine dogs (30%), the sentinel lymph node was not located in the regional lymphocentrum closest to the tumor. In five dogs, neoplasms drained simultaneously to two different lymphocentrum. Two axillary lymph nodes with macrometastasis of breast carcinoma did not show fluorescence. No patient experienced adverse reactions resulting from local injection of ICG. Considering the results obtained during this study, it can be concluded that the learning curve for mapping and detecting sentinel lymph nodes during the pre-surgical and intraoperative periods through the NIR image prototype is simple, fast and safe. A disadvantage of the NIR prototype is its reduced ability to detect sentinel lymph nodes in relatively deep anatomical regions, but it is applicable in the routine of veterinary cancer surgery.

Key words: lymphocentrum – lymphadenectomy – indocyanine green – mammary cancer – cutaneous cancer

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. Introdução

O status atual dos estudos relacionados com linfonodo sentinela em cães demonstram a importância do tema em alguns tipos de neoplasmas altamente metastáticos pela via linfática. Portanto, a linfadenectomia seletiva do linfonodo sentinela e correspondente estudo histopatológico desempenham um papel importante no estadiamento, prognóstico e seleção do tratamento. (Tuohy et al., 20009; Beer et al., 2017; Liptak, 2019)

Várias são os métodos relatados para a marcação e mapeamento do linfonodo sentinela em cães. Estudos experimentais demonstraram que a linfocintilografia regional ou intraoperatória com radioisótopo tecnécio (Tc99m) é a técnica padrão pela alta sensibilidade para a detecção do linfonodo sentinela em cães (Balogh et al., 2002; Pereira et al., 2008; Aquino et al., 2012). Porém, essa técnica não é aplicável para a rotina oncológica veterinária já que demanda de instalações e equipamentos onerosos (Worley, 2014). Nesse sentido, os corantes vitais como azul patente V a 2,5% e azul de metileno 1% são habitualmente utilizados no período intraoperatório, resultando numa técnica barata, facilmente acessível e aparentemente segura (Beserra et al., 2016), apesar de que a sensibilidade é menor em relação à linfocintilografia (Balogh et al., 2002; Pereira et al., 2008; Worley, 2014) e linfografia indireta (Brissot e Edery, 2017). Outra alternativa prática para o mapeamento pré-operatório do linfonodo sentinela é a linfografia radiográfica indireta com lipiodol® (Brissot e Edery, 2017), que associada ao azul de metileno diminuem os erros na detecção intraoperatória do linfonodo sentinela.

Atualmente, outro método para a detecção do linfonodo sentinela em oncologia médica é a associação de um corante orgânico chamado indocianina verde e uma fonte de luz emitida por um equipamento de imagem de fluorescência no infravermelho próximo (NIR near infrared imaging ou NIRF near infrared fluorescence imaging) (Stoffels et al., 2015; Keating et al., 2017). Possivelmente, a vantagem desta técnica em comparação a linfocintilografia com radioisótopo, aos

corantes vitais e a linfografia indireta com lipiodol é a fácil localização transcutânea do trajeto linfático subcutâneo e do linfonodo sentinela superficial, em tempo real, tanto no pré-operatório, como também no intraoperatório, virando uma alternativa prática e aplicável na oncologia veterinária. Porém, poucos são os sistemas de imagem NIR disponíveis comercialmente para uso em cirurgia oncológica (DSouza et al., 2016) o que pode resultar em investimentos financeiros elevados.

Diante disso, a proposta deste estudo foi criar um protótipo de imagem de fluorescência no infravermelho próximo aplicado à rotina da cirurgia oncológica veterinária. Posteriormente, determinar a aplicabilidade do protótipo para o mapeamento do linfonodo sentinela em cães com neoplasmas malignos sólidos cutâneos e mamários. A hipótese foi que após a injeção intradérmica e peritumoral de indocianina verde o protótipo de imagem no infravermelho próximo facilita o reconhecimento fluorescente transcutâneo dos vasos linfáticos e do linfonodo sentinela correspondente, em tempo real, tanto no período pré-operatório e intraoperatório, em cães com neoplasmas sólidos cutâneos ou mamários.

2. Revisão de literatura

2.1 Linfonodos

O sistema linfático é composto por uma rede de vasos linfáticos (linfáticos iniciais, pré-coletores, coletores, troncos e dutos), por órgãos linfoides primários (timo, medula óssea) e por órgãos linfóides secundários (linfonodos, baço, tonsilas, placas de Peyer) (Mumprecht e Detmar, 2009; Margaris e Black, 2012; Haley, 2017).

Os linfonodos se formam a partir de sacos linfáticos primários que brotam nas células endoteliais das veias embrionárias. Posteriormente, os sacos linfáticos são envolvidos pelo tecido conjuntivo adjunto, dando origem à cápsula e internamente as trabéculas (Mebius, 2003; Onder e Ludewig, 2018).

Macroscopicamente os linfonodos têm formato de feijão ou rim, sendo envoltos por uma cápsula fibrosa. Os vasos sanguíneos (artéria e veia) se localizam no hilo (lado côncavo linfonodal). Os vasos linfáticos aferentes penetram a cápsula pelo lado convexo do linfonodo para se unir aos seios subcapsulares e

peritrabeculares; entretanto, os vasos linfáticos aferentes surgem dos seios medulares e deixam o linfonodo pelo hilo (Bacha e Bacha, 2000) em pequenos animais. Internamente o linfonodo se divide em córtex (nódulos linfoides, centro germinal, seio cortical) e medula (seio medular, cordão medular). No córtex os nódulos ou folículos linfoides estão constituídos principalmente por linfócitos pequenos, densamente compactados. O centro germinal constitui a área pálida do nódulo, sendo esta contornada por uma zona marginal ou periférica de pequenos linfócitos. O seio cortical conecta os seios subcapsulares com os seios medulares (Bacha e Bacha, 2000; Haley, 2017).

De acordo com Bezuidenthout (2013), os linfonodos são a unidade estrutural e funcional do sistema linfático, atuam como filtro da linfa e são um centro germinativo para os linfócitos. Normalmente, os linfonodos se encontram inseridos no trajeto dos vasos linfáticos, atuando na resposta imune como centros de vigilância regionais em específicos pontos anatômicos (Onder e Ludewig, 2018).

O linfonodo regional se refere a um ponto de filtração linfática que recebe linfa primária de um órgão ou região do corpo (Bezuidenthout, 2013; Singh, 2018), entretanto, um linfocentro é um linfonodo ou grupo de linfonodos presentes numa mesma região corporal que recebem vasos linfáticos aferentes da mesma região (Bezuidenthout, 2013; Singh, 2018). Suami et al. (2013), nomeou de territórios linfáticos cutâneos (linfossomos) submandibular; parotídeo; cervical superficial dorsal; axilar; ilíaca medial; sacral lateral; hipogástrico; poplíteo; inguinal superficial e cervical superficial ventral, de acordo com a área de drenagem linfáticas que correspondem aos linfonodos regionais.

2.1.1 Vasos linfáticos

Dentro do sistema linfático, a principal função dos vasos linfáticos é manter a homeostase dos fluidos intersticiais, absorvendo linfa acumulada no espaço intersticial e transportando-a de volta para a circulação venosa (Moore e Bertram, 2018). Assim sendo, toda a linfa passa pelo menos por um linfonodo em seu trajeto desde os tecidos até a circulação sanguínea (Singh, 2018). Desse modo, o linfonodo torna-se uma barreira para a disseminação de infecções ou de células neoplásicas

(Shayan et al., 2006; Dieterich e Detmar, 2016). Os vasos linfáticos também atuam como um meio de transporte de células imunológicas que participam ativamente na resposta imunológica adaptativa (Karpanen e Alitalo, 2008; Betterman e Harvey, 2016).

A captação da linfa desde o interstício do sistema tegumentar dos mamíferos acontece através dos chamados capilares linfáticos iniciais. Estes capilares estão localizados na derme superficial. Estruturalmente são de terminação cega, de baixa pressão, mas muito permeáveis e, desprovidos de uma lamina basal contínua. Os capilares linfáticos iniciais funcionam como válvulas unidirecionais, fazendo com que a linfa e macromoléculas fluam para os vasos pré-coletores (Betterman e Harvey, 2016). Os vasos linfáticos pré-coletores, se localizam na derme profunda e são encarregados da drenagem e propulsão da linfa desde os capilares linfáticos iniciais para os vasos linfáticos coletores. Eles têm válvulas primárias unidirecionais e endotélio revestido por uma ou várias camadas de músculo liso, promovendo contrações espontâneas. Porém, em algumas porções, a sua estrutura é semelhante à dos capilares linfáticos iniciais (Shayan et al., 2006; Margaris e Black, 2012).

Os vasos linfáticos coletores estão localizados no tecido subcutâneo. Em relação aos anteriores, são de maior diâmetro e têm três túnicas (íntima, média e adventícia) sendo estas compostas por células endoteliais, músculo liso e fibras de colágeno, respectivamente (Margaris e Black, 2012). As válvulas secundárias intraluminais, bicúspides (impedem o fluxo retrogrado) e a presença de linfangions (espaço compreendido entre cada válvula). Os linfangions possuem inervação simpática e parassimpática e atuam como um marca-passos próprio que impulsiona a linfa (Shayan et al., 2006; Margaris e Black, 2012; Moore e Bertram, 2018). A linfa flui para o interior do linfonodo por meio de vasos linfáticos aferentes. Os vasos linfáticos eferentes deixam o linfonodo transportando a linfa filtrada e enriquecida com linfócitos, chamada de linfa secundária (Bezuidenhout, 2013). Finalmente, os vasos linfáticos eferentes se fundem em troncos linfáticos e depois em ductos, os quais são a principal via de retorno da linfa nas veias jugular e/ou subclávia (Shayan et al., 2006; Bezuidenhout, 2013).

2.1.2 Linfangiogênese

Segundo Dieterich e Detmar (2016) a linfangiogênese é a formação de novos vasos linfáticos a partir de vasos pré-existentes. Sabe-se que a linfangiogênese acompanha à angiogênese (Alitalo e Carmeliet, 2002; Karpanen e Alitalo, 2008). Por esse motivo, para diferencia-los entre vasos sanguíneos e vasos linfáticos foram estudados marcadores específicos para vasos linfáticos como por exemplo, o fator de transcrição da homeobox Prox1, restrito ao endotélio linfático, o fator de crescimento do endotélio vascular VEGF-C e VEGF-D, que se ligam ao VEGFR-3 nas células linfáticas endoteliais específico em tecidos adultos (LECs), o fator VEGF-A que atua no VEGFR-2 estimulando a proliferação das LECs, e outros marcadores que são de grande ajuda sobretudo para compreender a linfangiogênese induzida pelo câncer (Karpanen e Alitalo, 2008; Mumprecht e Detmar, 2009; Dieterich e Detmar, 2016).

Antes da descoberta dos marcadores linfáticos, alguns estudos propuseram que a invasão linfática acontecia de maneira passiva, à medida que a linfa carregada de células metastáticas desde o neoplasma primário drenava para os linfonodos locais mais próximos do neoplasma. Porém, atualmente é aceitado que existem interações complexas entre as células tumorais e as células do endotélio linfático (Shayan et al., 2006; Farnsworth et al., 2018). Por meio de estudos experimentais em camundongos foi demonstrado que a expressão aumentada dos fatores linfangiogênicos VEGF-D (Stacker et al., 2001) e VEGF-C (Skobe et al., 2001) são capazes de ativar o receptor VEGFR-3 localizado nas células endoteliais linfáticas dos vasos linfáticos, que atuam na linfangiogênese no câncer, promovendo assim a disseminação do tumor para os linfonodos regionais (Stacker et al., 2001; Skobe et al., 2001). Também foi relatado que uma associação entre hipóxia e linfangiogênese desempenham um papel importante na invasão, proliferação, metástase e resistência à terapia (Ji, 2014). A baixa tensão de oxigênio associada à necrose tumoral induz aumento da expressão do fator de transcrição HIF-1 α . Por sua vez, a ativação do HIF-1 α estimula a proliferação de células endoteliais, através da regulação positiva da expressão de membros da família VEGF (VEGF-A e VEGF-C)

que são potentes indutores da angiogênese tumoral, linfangiogênese e metástase para o linfonodo (Ji, 2014).

Vários estudos mostraram que a metástase no linfonodo é precedida de alterações no microambiente e da reorganização morfológica da estrutura interna do linfonodo sentinela, principalmente aumentando o suprimento sanguíneo e dilatação do lúmen dos seios linfáticos; além de manter um ambiente enriquecido de citocinas imunossupressoras. Todos esses mecanismos resumem a hipótese do nicho pré-metastático do sistema linfovascular no linfonodo sentinela (Pereira et al., 2015; Dieterich e Detmar, 2016). Nesse sentido, parece que o tumor primário prepara o microambiente tumoral para melhorar a “semeadura” das metástases subsequentes (Qian et al., 2006), via secreção do fator VEGF-C (Liersch et al., 2012).

Em oncologia veterinária, um estudo avaliou três marcadores de vasos linfáticos humanos (Prox-1, lyve-1, podoplanina, D2-40) em neoplasmas mamários de cadelas; mas, apenas o Prox-1 foi considerado um marcador adequado para vasos linfáticos em cadelas (Sleeckx et al., 2013). Outro estudo avaliou a proliferação das células endoteliais linfáticas intratumorais e peritumorais com Prox-1 em neoplasmas mamários benignos e malignos; porém, não observaram diferença significativa na densidade dos vasos entre esses tumores, mas houve diferença significativa em comparação com o tecido controle (Sleeckx et al., 2014). Também foi avaliado o valor prognóstico do fator induzível por hipóxia 1α (HIF- 1α) em cadelas com neoplasma mamário maligno, entretanto os resultados não confirmaram uma correlação entre HIF- 1α e as características clínico-patológicas (Moschetta et al., 2015).

2.1.3 Linfonodo sentinela

Em oncologia humana se define linfonodo sentinela (LS) como o primeiro linfonodo (dentro de uma bacia linfática regional) que recebe o fluxo linfático procedente de um neoplasma primário (Morton et al., 1992). A hipótese do LS afirma que a sua identificação e posterior estudo histopatológico prevê o status dos linfonodos remanescentes na bacia linfática regional. Se a avaliação histopatológica do LS demonstra células cancerígenas, será necessária a linfadenectomia dos

linfonodos restantes na mesma área anatômica (Shayan et al., 2006). Pelo impacto clínico positivo associado ao mapeamento do linfonodo sentinela e consecutiva linfadenectomia seletiva em pacientes com melanoma maligno e, com câncer de mama, o mapeamento do LS é considerado umas das técnicas mais importantes e inovadoras na cirurgia oncológica humana, uma vez que reduz a morbidade (linfedema e dor) por minimizar as complicações secundárias da linfadenectomia regional não seletiva ou aleatória (Ball et al., 2014).

Os primeiros relatos do linfonodo sentinela foram descritos por Gould et al. (1960) em pacientes com neoplasma em glândula parótida. Posteriormente, Cabanas et al. (1977), chamaram de linfonodo sentinela um linfocentro específico para onde drenava o carcinoma peniano primário. Depois, Fee et al. (1978) por meio da linfocintilografia cutânea, demonstraram que existem diversos padrões de drenagem linfática cutâneo e que podem variar entre os pacientes com melanoma maligno cutâneo primário, modificando assim a ideia de que existe um LS fixo por cada região corporal. Com base nesses estudos, o conceito do linfonodo sentinela, a descrição da técnica de mapeamento com corante vital e da biopsia intraoperatória do LS foi introduzido por Morton et al. (1992) em pacientes com melanoma cutâneo e, depois foi adaptado por Giuliano et al. (1994) para o mapeamento do câncer de mama em mulheres. Alex et al. (1993) estabeleceram a técnica de linfocintilografia para a localização guiada por sonda gama do LS marcado com substância colóide tecnécio 99m (Tc-99m) em pacientes com melanoma maligno cutâneo e posteriormente, Krag et al. (1993) utilizaram para o câncer de mama.

Atualmente, para o mapeamento do LS a associação da linfocintilografia (radiofármaco ou radiocoloide) com um corante vital (guia visual anatômica), em conjunto, são consideradas as técnicas padrões em virtude das maiores taxas de identificação do linfonodo sentinela e menor taxa de falso negativo em diversos tipos de neoplasmas em pessoas (Begaria et al., 2010; Stoffels et al., 2015; Niebling et al., 2016). A baixa sensibilidade dos marcadores para a detecção do LS podem aumentar a taxa dos linfonodos sentinela falso negativos, representando a proporção de casos em que a biopsia do linfonodo sentinela é negativa, mas os linfonodos remanescentes da bacia linfática abrigam células cancerígenas (Kataria et al., 2016).

As possíveis causas de ocorrência de um linfonodo sentinela falso negativo são obstrução do vaso linfático aferente por êmbolos tumorais ou por fibrose cirúrgica anterior, radioterapia ou inflamação local severa. Nessa condição, um caminho alternativo fica aberto e, o corante é direcionado para outro linfonodo livre de metástase (Karaman e Detmar, 2014; Kataria et al., 2016). Outra causa é a presença de duas vias linfáticas para uma mesma área neoplásica, ou raramente os vasos linfáticos podem passar para um linfonodo superior sem entrar em contato com o linfonodo implicado (Kataria et al., 2016).

Em oncologia veterinária, foi demonstrado que os linfonodos regionais com aumento do volume e/ou com alterações na sua forma e consistência durante a palpação, em muitos dos casos com neoplasmas sólidos malignos, quando foram avaliados microscopicamente não apresentaram metástase no estudo histopatológico (Williams et al., 2003; Tuohy et al., 2009). O mapeamento do linfonodo sentinela e subsequente biopsia seletiva em cães é mais justificável quando o tumor primário está localizado em regiões anatómicas que podem drenar para diferentes linfocentros próximos ou distantes, independentemente do tamanho do linfonodo regional mais próximo do neoplasma primário (Worley, 2014; Brissot e Edery, 2017; Grimes et al., 2017). Esses fatos foram demonstrados em um estudo retrospectivo em cães com melanoma oral, onde quatro de treze cães apresentavam metástases para quatro linfocentros diferentes (Skinner et al., 2017). Um estudo prospectivo de cães com mastocitoma cutâneo descreveram que oito de 19 cães (42%) tinham o LS em linfocentros inesperados, distante do linfonodo regional (Worley, 2014). Em outro estudo também a localização do LS não correspondia com linfonodo regional mais próximo em 20 de 25 neoplasmas sólidos (77,9%) (Brissot e Edery, 2016).

No que concerne ao tumor de mama, o padrão de drenagem do sistema linfático da cadeia mamária sem alterações neoplásicas foi padronizado por alguns estudos *in vivo* e *ex vivo*. A glândula mamária torácica cranial (M1) drena para o linfonodo axilar (Patsikas e Dessiris, 1996a; Pereira et al., 2003), ocasionalmente para o linfonodo cervical superficial (Pereira et al. 2008). Na maioria dos casos a glândula mamária torácica caudal (M2) drena para o linfonodo axilar (Patsikas e Dessiris, 1996a; Pereira et al., 2003), as vezes para o linfonodo axilar e linfonodo

esternal (Pereira et al., 2003; Pereira et al., 2008). A glândula mamária abdominal cranial (M3) drena simultaneamente para o linfonodo axilar e inguinal superficial (Patsikas e Dessiris, 1996b; Pereira et al., 2003), raramente pode drenar apenas para o linfonodo axilar (Patsikas e Dessiris, 1996b; Pereira et al., 2008) ou para o linfonodo inguinal superficial (Patsikas e Dessiris, 1996b). A glândula mamária M4 na maioria dos casos drena especificamente para os linfonodos inguinais superficiais (Patsikas e Dessiris, 1996a; Pereira et al., 2008) e raramente para os linfonodos inguinais superficiais e ilíaco medial (Patsikas e Dessiris, 1996a). Entretanto, a M5 drena para o linfonodo inguinal superficial (Patsikas e Dessiris, 1996a; Pereira et al., 2008), para os linfonodos inguinais superficiais e poplíteo (Pereira, 2003) ou para os linfonodos inguinais e ilíaco medial (Pereira et al., 2008). Porém, em presença de neoplasmas mamários, o padrão de drenagem pode-se modificar em alguns casos (Pereira et al., 2003; Patsikas et al., 2006; Soultani et al. 2016).

A pesquisa do linfonodo sentinela em oncologia veterinária tem recebido maior importância nesta última década (Tuohy et al., 2009; Beer et al., 2017), especialmente em neoplasmas que apresentam alto nível de metástase linfática como o carcinoma mamário (Patsikas et al., 2006; Soultani et al., 2017; Beserra et al., 2016), mastocitoma cutâneo canino (Worley, 2014; Beer et al., 2019; Ferrari et al., 2018), melanoma oral (Grimes et al., 2017; Skinner et al., 2017) e carcinoma do saco anal (Majeski et al., 2017). Entre os métodos ou técnicas relatadas para o mapeamento do linfonodo sentinela em cães constam os marcadores colorimétricos azul patente V à 2,5% (Pinheiro et al., 2003; Aquino et al., 2012; Beserra et al., 2016), hemosiderina (Pinheiro et al., 2009), azul de metileno à 1% (Wells et al., 2006; Worley, 2014; Brissot e Edery, 2016; Beer et al., 2019), azul isossulfan (Suami et al. 2013) e fluoresceína (Pereira et al., 2003; Wells et al., 2006). Outros métodos não colorimétricos para marcação do linfonodo sentinela são a linfografia indireta com óleo iodado (Lipiodol®) seguida de radiografia (Brissot e Edery, 2016). Linfografia tomográfica computadorizada indireta com iopamidol (Soultani et al., 2017; Majeski et al., 2017) ou com iohexol (Grimes et al., 2017; Rossi et al., 2017), ultrassom assistido por contraste com microbolhas (Lurie et al., 2006, Favril et al., 2019), avaliação indireta mediante ultrassom em modo M e elastografia (Silva et al., 2018; Belota et al., 2019), indocianina verde com imagem no infravermelho próximo

(Suami et al. 2013; Townsend 2018; Beer et al., 2019; Favril et al., 2019) e linfocintilografia com utilização de diversos tipos de solução coloidal associada ao tecnécio 99 (Tc-99m) (Balogh et al., 2002; Pinheiro et al., 2003; Pereira et al., 2008; Worley et al., 2014; Pinheiro et al., 2009; Beer et al., 2019).

Da mesma maneira que em oncologia humana, a linfocintilografia com Tc-99m é considerada a técnica padrão para a detecção do linfonodo sentinela em cães, porém uma desvantagem dessa técnica é o investimento em instalações credenciadas para manejo de materiais radioativos e, além disso, o custo de cada procedimento é elevado em comparação com outros marcadores, por esses motivos, a linfocintilografia não é um método de escolha na rotina oncológica veterinária, sendo então substituída por marcadores colorimétricos. Um estudo realizado em cadelas com neoplasma mamário demonstrou que o azul patente V 2,5% tem uma sensibilidade de 89,5% e especificidade de 100% para o mapeamento do linfonodo sentinela (Beserra et al., 2016). Em outro estudo para mapeamento do LS em 19 cães com mastocitoma cutâneo constatou-se que em 18 cães os LS estavam corados pelo azul de metileno; entretanto, a linfocintilografia no intraoperatório detectou o LS em todos os 19 cães (Worley, 2014). Em outro estudo de casos por meio da linfografia radiográfica indireta o LS foi identificado em 29/30 (96,6%) casos; entretanto, dos 26 estudos realizados associando as duas técnicas, houve concordância com azul de metileno em 22 casos (84,6%) (Brissot e Edery, 2016). Uma das vantagens dos corantes vitais, além do baixo custo e rápida curva de aprendizado, é fornecer uma guia visual rápido para identificar os linfonodos sentinela no transoperatório, diminuindo o tempo cirúrgico e melhorando a eficácia. Mas, as desvantagens são possíveis falsos negativos, contaminação visual do campo operatório (tatuagem temporária dos tecidos) e possíveis efeitos adversos como reações anafiláticas; porém, em cães não foram relatados efeitos adversos como ocorrem em humanos (Balogh et al., 2002; Worley, 2014; Beserra et al., 2016; Brissot e Edery, 2016).

2.2 Imagem no infravermelho próximo

A imagem de fluorescência no infravermelho próximo NIR (near infrared imaging) ou NIRF (near infrared fluorescence imaging) é uma técnica de imagem óptica não invasiva, de alta resolução, para detecção de câncer em tempo real. Surgiu na cirurgia oncológica humana para determinar, no transoperatório, a extensão ou infiltração local dos neoplasmas sólidos em tecidos moles e/ou para identificar a presença de células neoplásicas residuais entre os tecidos normais adjacentes (Tanaka et al., 2006; Schaafsma et al., 2011; Holt et al., 2014).

No espectro eletromagnético, entre a faixa espectral visível (400 – 700 nm) e a faixa espectral invisível infravermelha existe uma janela óptica chamada infravermelho próximo (700 – 900 nm). No espectro visível, os cromóforos biológicos, particularmente a hemoglobina, absorvem comprimentos de onda mais curtos ($\approx$ 500 – 600 nm), entretanto, no espectro infravermelho (950 - 1100 nm) a água e lipídios absorvem comprimentos de luz mais longos. Então, a absorção combinada desses componentes se traduz em uma janela de imagem óptica ou faixa NIR (700 – 900 nm), onde o coeficiente de absorção de luz dos tecidos e a dispersão de fótons são mínimos, apresentando vantagens para as técnicas de imagem NIR (Hilderbrand e Weissleder, 2010; Holt et al., 2020) com obtenção de imagens de contraste suficiente e sensíveis em tempo real, sem alteração do campo cirúrgico (Choy et al., 2003; Schaafsma et al., 2011).

Para fornecer imagens de fluorescência NIR visíveis ao olho humano no infravermelho próximo é necessária uma fonte de luz de excitação obtida a partir de um sistema de imagem por fluorescência NIR, que, após entrar em contato com um fluoróforo (por exemplo a indocianina verde) geram um sinal fluorescente visível (Choy et al., 2003; Troyan et al., 2009; Hirche et al., 2012). Existem vários sistemas de imagem por fluorescência NIR disponíveis comercialmente (PDE, SPY, Fluobeam) e não comerciais, apenas para uso em pesquisa (FLARE, Mini-FLARE, FDPm, Hyper Eye) (Gioux et al., 2010; Souza et al., 2016). As especificações técnicas desses sistemas variam sobretudo na fonte de luz de excitação que podem ser de lâmpadas de banda larga filtradas, diodos a laser ou diodos emissor de luz

(LEDs). Outros componentes do sistema são os espelhos e filtros de coleta de luz, câmeras, o hardware e software de controle (Gioux et al., 2010; Souza et al., 2016).

No que tange aos fluoróforos fluorescentes, segundo Hirche et al. (2012) um fluoróforo NIR é um composto químico que converte a luz NIR de um comprimento de onda em luz NIR de comprimento de onda diferente. Ao brilhar a luz NIR invisível de alta intensidade de um comprimento de onda no campo cirúrgico e detectar a luz NIR invisível desse comprimento de onda diferente, pode ser determinada a localização exata do fluoróforo NIR. Para Luo et al. (2011) um fluoróforo ideal deve funcionar na faixa espectral ou janela NIR, com interferência mínima entre absorção e espectro de emissão, alto coeficiente de absorção molar e rendimento quântico para fluorescência intensa, química e foto-estabilidade suficientes em solventes, tampões ou condições biológicas para imagem ou detecção e, boa solubilidade em água, para evitar a agregação de corantes em ambiente aquoso, virando um desafio.

De forma geral, os fluoróforos (agentes de contraste fluorescentes no infravermelho próximo) são classificados em moléculas inorgânicas e orgânicas. As moléculas inorgânicas associam-se principalmente a pontos quânticos (QDs) e outras nanopartículas (NPs). No entanto, os corantes fluorescentes NIR orgânicos como a família das cianinas, exibem conjugação viável com vários tipos de moléculas inespecíficas (sondas não direcionadas) ou específicas (sondas direcionadas) em diferentes tipos de neoplasmas sólidos cutâneos (Luo et al., 2011). Atualmente, além da indocianina verde, novos agentes de contraste fluorescentes direcionados foram testados em cães com neoplasmas sólidos cutâneos espontâneos. As sondas direcionadas VM249 (Eward et al., 2013) e a LUM015 (De Witt et al., 2016) demonstraram sinais de fluorescência aceitáveis para diferenciar tecidos normais dos neoplásicos após entrar em contato com as catepsinas superexpressas no mastocitoma cutâneo e no sarcoma de partes moles. No caso de LUM015 apresentou sensibilidade e especificidade de 92% para a detecção de câncer (De Witt et al., 2016). Em outro estudo avaliaram uma sonda NIR direcionada (OTL0038) para receptores de folato em neoplasmas primárias de pulmão em 10 cães. A fluorescência tanto no tumor primário quanto nos linfonodos acometidos foi observada em todos os pacientes, demonstrando aplicabilidade clínica (Keating et al., 2017). Os resultados desses estudos são promissores e não foram relatados efeitos

adversos associados aos agentes de contrastes fluorescente, porém ainda precisam de mais pesquisas para melhorar a sensibilidade das sondas para diferenciar tecido neoplásico do tecido normal, em tempo real no transoperatório.

2.2.1 Indocianina verde

A indocianina verde (ICV) é um corante orgânico, pertencente à família das cianinas. É anfifílico (sonda tricarboxianina), aniônico, solúvel em água, mas relativamente hidrofóbica, com massa molecular de 776 Da (Madajewski et al., 2012; Schaafsma et al., 2011) e diâmetro hidrodinâmico de 1,2 nm (Polom et al., 2011). Além disso, o corante ICV tem uma alta eficiência quântica (brilho) e é razoavelmente estável no sangue (Reynolds et al., 1999). As moléculas hidrofóbicas da ICV apresentam elevada taxa de ligação às proteínas séricas, especialmente à albumina, reduzindo a agregação e aumentando o rendimento quântico (brilho) em mais de três vezes, assim, favorecendo o diâmetro hidrodinâmico efetivo (Schaafsma et al., 2011). No plasma, a onda de excitação da ICV que produz fluorescência é próxima de 800 nm e o pico máximo de emissão é de 840 nm. Assim, tanto a luz de excitação quanto a emissão se enquadram na janela biológica ou terapêutica NIR (Reynolds et al., 1999; Kitai et al., 2005).

A ICV é uma sonda NIR não direcionada, sendo portanto uma sonda sem alvo (Rao et al., 2007; Luo et al., 2011) apresentando limitada seletividade tumoral intrínseca em relação de outras sondas NIR orgânicas direcionadas para catepsinas, caspases, metaloproteinases, expressadas pelos diferentes neoplasmas sólidos (Eward et al., 2013; De Witt et al., 2016; Keating et al., 2017). Portanto, tem pouca utilidade em oncologia clínica (Patel et al., 2015) porque não parece diferenciar tecidos normais dos patológicos, provavelmente, porque a absorção líquida não seletiva da ICV ocorre através de mecanismos paralelos em tecidos normais e patológicos (Gurfinkel et al., 2000). Por outro lado, segundo Madajewski et al. (2012) a ICV é avidamente absorvido em tumores sólidos que têm "capilares com vazamento" devido ao efeito de permeabilidade e retenção (EPR), conforme hipótese emitida por Singhal et al. (2010). Para eles, o efeito EPR é uma propriedade que utilizam as moléculas pequenas (nanopartículas) para se acumular

em neoplasmas, aproveitando a presença de células endoteliais defeituosas e de amplas fenestrações que caracterizam a neovascularização nos tecidos do câncer (Greish, 2007).

De acordo com Polom et al. (2011) e Schaafsma et al. (2011) atualmente a ICV tem três indicações em cirurgia oncológica humana em tempo real: 1) mapeamento de linfonodos sentinela, para visibilizar os canais linfáticos e detecção de linfonodos, além de avaliação do linfedema; 2) identificação intraoperatória (margem de segurança) de tumores sólidos após injeção de ICV e 3) angiografia durante a cirurgia reconstrutiva para avaliar a perfusão tecidual ou circulação microvascular de retalhos livres para fechamento de defeitos após a cirurgia oncológica.

Conforme Schaafsma et al. (2011) a ICV, após sua administração endovenosa, tem um curto intervalo de ação (150 a 180 segundos) e é metabolizada exclusivamente pelo fígado, apresenta baixa toxicidade, com risco de reações alérgicas de 1: 10.000 pessoas. A dose utilizada para procedimentos de diagnóstico padrão na medicina humana variam entre 0,1 e 0,5 mg/kg. Possivelmente, com doses acima de 0,5 mg/kg a incidência de reações alérgicas imediatas aumentam. Segundo Polom et al. (2011) para determinar a dose ideal de ICV estudos controlados precisam ser feitos.

Em animais, a dose administrada de ICV muda segundo o objetivo da pesquisa. Reynolds et al. (1999) injetou 1mg/kg pela via endovenosa em bolos com solução fisiológica, com objetivo de detectar tumor de mama. Gurfinkel et al. (2000) também fizeram uso da mesma dose e via de administração da ICV para detecção de tumor mamário em cadelas. Nos dois estudos, a injeção do corante ICV foi imediatamente após os pacientes serem anestesiados e as imagens foram realizadas 10 minutos após administração do corante. Em outro estudo para identificação intraoperatória da extensão de carcinoma hepatocelular canino, a ICV foi injetada via endovenosa em dose de 0,5mg/kg, 12 – 18 horas antes da cirurgia (Iida et al., 2013). Em quatro estudos para mapeamento do linfonodo sentinela em cães, a dose de ICV pela via intradérmica foi de 0,5 mg/mL/cão (Suami et al. 2013; Townseend 2018; Beer et al., 2019; Favril et al., 2019). Em nenhum desses estudos

realizados em cães relataram reações adversas associadas à ICV, sugerindo que é um corante seguro para à pesquisa em cães.

Em comparação à oncologia humana, em oncologia veterinária poucos são os estudos que demonstram a importância do mapeamento do linfonodo sentinela e o papel que desempenha o mecanismo da linfangiogênese no microambiente tumoral em neoplasmas altamente metastáticos como o mastocitoma canino, em carcinomas e melanomas malignos. Entender mais detalhadamente o mecanismo da metástase linfática em cães promoverá o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento ou aprimoramento das modalidades terapêuticas disponíveis para o tratamento dos neoplasmas altamente agressivos e metastáticos pela via linfática.

REFERÊNCIAS*

Alex JC, Weaver DL, Fairbank JT, Rankin BS, Krag DN (1993) Gamma-probe-guided lymph node localization in malignant melanoma. **Surgical Oncology** 2:303-308.

Alitalo K, Carmeliet P (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. **Cancer Cell** v:219-227.

Aquino JU, Pinheiro LGP, Vasques PHD, Rocha JIX, Cruz DA, Beserra HEO, Cavalcante RV (2012) Experimental canine model for sentinel lymph node biopsy in the vulva using technetium and patent blue dye. **Acta Cirúrgica Brasileira** 27:102-108.

Bacha WJ, Bacha LM (2000) Lymphatic system. In.: Bacha WJ, Bacha LM (Eds) **Color Atlas of Veterinary Histology**, Baltimore, Maryland, p.69-84.

Bagaria SP, Faries MB, Morton DL (2010) Sentinel node biopsy in melanoma: technical considerations of procedure as performed at the John Wayne Cancer Institute. **Journal of Surgical Oncology** 108: 669-676.

*Segundo as normas para elaboração e dissertação e tese dos programas de Pós-Graduação, da FCAV, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2018.

Ball CG, Sutherland F, Kirkpatrick AW, Dixon E, Maclean AR, Mack LA, Feliciano DV, Rajani RR, Karmy-Jones R, Buie WD, Temple WJ, Rozycki GS, Simeone A (2010) Dramatic innovations in modern surgical subspecialties. **Canadian Medical Association** 53:335-341.

Balogh I, Thuróczy J, Andócs G, Máthé D, Chaudhari P, Perge E, Biksi I, Polyák A, Király R, Jánoki G (2002) Sentinel lymph node detection in canine oncological patients. **Nuclear Medicine Review in Central and Eastern Europe** 5:139-144.

Beer P, Pozzi A, Rohrer Bley C, Bacon N, Pfammatter NS, Venzin C (2017) The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. **Veterinary and Comparative Oncology** 16:178-187.

Beer P, Venzin C, Rohrer BC, Giovanoli P, Smolders LA, Pozzi A (2019) A comparison of near-infrared fluorescence imaging, lymphoscintigraphy and methylene blue dye method for intraoperative sentinel lymph node mapping in canine cell tumors: A prospective case series. Scientific presentation abstracts: 2019 European College Veterinary Surgeons 28th Annual Scientific Meeting, July 2-4, 2019-Budapest, Hungary. **Veterinary Surgery** 48: 667. Doi:10.1111/vsu.13248.

Belotta AF, Gomes MC, Rocha NS, Melchert A, Giuffrida R, Silva JP, Mamprim MJ (2019) Sonography and sonoelastography in the detection of malignancy in superficial lymph nodes of dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 33:1403-1413.

Beserra HEO, Grandi F, Dufloth RM, Pinheiro LGP (2016) Metastasis of mammary carcinoma in bitches: evaluation of the sentinel lymph node technique. **Advances in Breast Cancer Research** 5:58-65.

Betterman KL, Harvey NL (2016) The lymphatic vasculature: development and role in shaping immunity. **Immunological Reviews**, 271:276-292.

Bezuidenhout AB (2013) The lymphatic System. In.: Evans HE, de Lahunta A (Eds) **Miller's Anatomy of the Dog**. St. Luis: Missouri, p. 535-559.

Brissot HN, Edery EG (2017) Use of indirect lymphography to identify sentinel lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours. **Veterinary and Comparative Oncology** 15 Veterinary and Comparative Oncology 15:740-753.

Choy G, Choyke P, Libutti SK (2003) Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. **Molecular Imaging** 2:303-312.

DeWitt SB, Eward WC, Eward CA, Lazarides AL, Whitley MJ, Kirsch DG, Brigman BE, Ferrer JM, Berg J (2016) A novel Imaging system distinguishes neoplastic from normal tissue during resection of soft tissue sarcomas and mast cell tumors in dogs. **Veterinary Surgery** 45:715-722.

Cabanas R (1977) An approach for the management of penile cancer. **Cancer** 39:456-466.

Dieterich LC, Detmar M (2016) Tumor lymphangiogenesis and new drug development. **Advanced Drug Delivery Reviews** 99:148-160.

Dogan NU, Dogan S, Favero G, Köler C, Dursun P (2019) The basics of sentinel lymph node biopsy: anatomical and pathophysiological considerations and clinical aspects. **Journal of Oncology** 2019:1-10, 2019.

DSouza AV, Lin H, Henderson ER, Samkoe KS, Pogue BW (2016) Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging. **Journal of Biomedical Optics** 21:080901-1-15.

Eward WC, Mito JK, Eward CA, Carter JE, Ferrer JM, Kirsch DG, Brigman BE (2012) A novel imaging system permits real-time in vivo tumor bed assessment after resection of naturally occurring sarcomas in dogs. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 471:834-842.

Farnsworth RH, Achen MG, Stacker SA (2018) The evolving role of lymphatics in cancer metastasis. **Current Opinion in Immunology** 53:64-73.

Favril S, Stock E, Hernot S, Hesta M, Polis I, Vanderperren K, de Rooster H (2019) Sentinel lymph node mapping by near-infrared fluorescence imaging and contrast-enhanced ultrasound in healthy dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 17:89-98.

Fee HJ, Robinson DS, Sample WF, Graham LS, Holmes EC, Morton DL (1978) The determination of lymph shed by colloidal gold scanning in patients with malignant melanoma: a preliminary study. **Surgery** 84:626-632.

Ferrari R, Marconato L, Buracco P, Boracchi P, Giudice C, Iussich S, Grieco V, Chiti LE, Favretto E, Stefanello D (2018) The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. **Veterinary and Comparative Oncology** 16:505-510.

Gioux S, Choi HS, Frangioni JV (2010) Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. **Molecular Imaging** 9:237-255.

Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL (1994) Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. **Annals of Surgery** 220:391-398.
Gould EA, Winship T, Pholbin PH, Kerr HH (1960) Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. **Cancer** 13:77-78.

Greish K (2007) Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: a royal gate for targeted anticancer nanomedicines. **Journal of Drug Targeting** 15:457-464.

Grimes JA, Secrest SA, Northrup NA, Saba CF, Schmiedt CW (2017) Indirect computed tomography lymphangiography with aqueous contrast for evaluation of sentinel lymph nodes in dogs with tumors of the head. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 58: 559-564.

Gurfinkel M, Thompson AB et al. (2000) Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for the detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: a case study. **Photochemistry and Photobiology** 72:94-102.

Haley P (2017) The lymphoid system: a review of species differences. **Journal of Toxicologic Pathology** 30:111-123.

Hilderbrand SA, Weissleder R (2010) Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. **Current Opinion Chemical Biology** 14:71-79.

Hirche C, Engel H, Kolios L, Cognie JVS, Hünerbein M, Lehnhardt M, Kremer T (2012) An experimental study to evaluate the Fluobeam 800 imaging system for fluorescence-guided lymphatic imaging and sentinel node biopsy. **Surgical Innovation** 20:516-523.

Holt D, Okusanya O et al. (2014) Intraoperative near-infrared imaging can distinguish cancer from normal tissue but not inflammation. **PLoS One** 9:1-11.

Holt D, Singhal S, Selmic LE (2020) Near-infrared imaging and optical coherence tomography for intraoperative visualization of tumors. **Veterinary Surgery** 49:33-43.

Iida G, Asano K, Seki M, Ishigaki K, Teshima K, Yoshida O, Edamura K, Kagawa Y (2013) Intraoperative identification of canine hepatocellular carcinoma with indocyanine green fluorescent imaging. **Journal of Small Animal Practice** 54:594-600.

Ji RC (2014) Hypoxia and lymphangiogenesis in tumor microenvironment and metastasis. **Cancer Letters** 346:6-16.

Karaman S, Detmar M (2014) Mechanisms of lymphatic metastasis. **The Journal of Clinical Investigation** 124:922-928.

Karpanen T, Alitalo K (2008) Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. **Annual Reviews of Pathology** 3:367-397.

Kataria K, Srivastava A, Qaiser D (2016) What is a false negative sentinel node biopsy: definition, reasons and ways to minimize it?. **Indian Journal of Surgery** 78:396-401.

Keating JJ, Runge JJ, Singhal S, Nims S, Venegas O, Durham AC, Swain G, Nie S, Low PS, Holt DE (2017) Intraoperative near-infrared fluorescence imaging targeting folate receptors identifies lung cancer in a large-animal model. **Cancer** 123:1051-1060.

Kitai T, Inomoto T, Miwa M, Shikamaya T (2005) Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. **Breast Cancer** 12:211-215.

Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT (1993) Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. **Surgical Oncology** 2:335-340.

Liersch R, Hirakawa S, Berdel WE, Mesters RM, Detmar M (2012) Induced lymphatic sinus hyperplasia in sentinel lymph node by VEGF-C as the earliest premetastatic indicator. **International Journal of Oncology** 41: 2073-2078.

Liptak JM (2019) Nonselective lymph node dissection and sentinel lymph node mapping and biopsy. **Veterinary Clinics Small Animal Practice** 49:793-807.

Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C (2011) A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. **Biomaterials** 32:7127-7138.

Madajewski B, Judy BF, Mouchli A, Kapoor V, Holt D, Wang MD, Nie S, Singhal S (2012) Intraoperative Near-Infrared Imaging of Surgical Wounds after Tumor Resections Can Detect Residual Disease. **Clinical Cancer Research** 18:5741-5751.

Majeski SM, Steffey MA, Fuller M, Hunt GB, Mayhew PD, Pollard RE (2017) Indirect computed tomographic lymphography for iliosacral lymphatic mapping in a cohort of dogs with anal sac gland adenocarcinoma: technique description. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 58:295-303.

Margaris KN, Black RA (2012) Modelling the lymphatic system: challenges and opportunities. **Journal of The Royal Society Interface** 9:601-612.

Mebius RE (2003) Organogenesis of lymphoid tissues. **Nature Reviews Immunology** 3:292-303.

Moore JEJ, Bertram CD (2018) Lymphatic system flows. **Annu Rev Fluid Mech** 50:459-482.

Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ (1992) Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. **Archives of Surgery** 127:392-399.

Moschetta MG, Maschio LB, Jardim-Perassi BV, Gelaleti GB, Lopes JR, Leonel C, Gonçalves N, Ferreira LC, Martins GR, Borin TF, Zuccari DAC (2015) Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in canine malignant mammary tumors. **Oncol Reports** 33:2345-2353.

Mumprecht V, Detmar M (2009) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** 13:1405-1416.

Niebling MG, Pleijhuis RG, Bastiaannet E, Brouwers AH, van Dan GM, Hoekstra HJ (2016) A systematic review and meta-analyses of sentinel lymph node identification in breast cancer and melanoma, a plea for tracer mapping. **European Journal of Surgical Oncology** 42:466-473.

Onder L, Ludewig B (2018) A fresh view on lymph node organogenesis. **Trends in Immunology – Cells Press** 39:775-787.

Patel NJ, Manivannan E, Joshi P, Ohulchanskyy TJ, Nani RR, Schnermann MJ, Pandey RK (2015) Impact of substituents in Tumor Uptake and Fluorescence. Imaging Ability of Near-Infrared Cyanine-like dyes. **Photochemistry and Photobiology** 91:1219-1230.

Patsikas MN, Dessiris AK (2006a) The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: The 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. **Anatomia, Histologia, Embryologia** 25:131-138.

Patsikas MN, Dessiris AK (2006b) The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part II: The 3rd mammary gland **Anatomia, Histologia, Embryologia** 25:139-143.

Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidov E, Papazoglou LG, Papadopoulou PL, Tzegas SI, Tziris NE, Kaitzis DG, Dimitriadis AS, Dessiris AK (2006) The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia, Histologia, Embryologia** 35:228-234.

Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, Ribeiro AA (2003) Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? **Anatomia, Histologia, Embryologia** 32: 282-290.

Pereira CT, Marques FL, WILLIAMS J, De Martin B, Bombonato PD (2008) ^{99m}Tc-Labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 49:487-491.

Pereira ER, Jones D, Jung K, Padera TP (2015) The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 38: 98-105.

Pinheiro LGP, Moraes MO, Soares AH, Lopes AJT, Nagueire MASP, Gondim FAL, Brandão CB, Nascimento DCH, Soares JPH, Silva JMM (2003) Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio TC99m. **Acta cirúrgica Brasileira** 18:514-517.

Pinheiro LGP, Filho RSO, Vasques PHD, Filgueira PHO, Aragão DHP, Barbosa PME, Beserra HEO, Cavalcante RV (2009) Hemosiderin. A new marker for sentinel lymph node identification. **Acta cirúrgica Brasileira** 24:432-436.

Polom K, Murawa D, Rho YS, Nowaczyk P, Hunerbein M, Murawa P (2013) Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology: a literature review. **Cancer** 117:4812-4822.

Qian CN, Berghuis B et al. (2006) Preparing the “soil”: the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. **Cancer Research** 66:10365-10376.

Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H (2007) Fluorescence imaging in vivo: recent advances. **Current Opinion in Biotechnology** 18:17-25.

Reynolds JS, Troy TL, Mayer RH, Thompson AB, Waters DJ, Cornell KK, Snyder PW, Sevvick-Muraca EM (1999) Imaging of spontaneous canine mammary tumors using fluorescent contrast agents. **Photochemistry and Photobiology** 70:87-94.

Rossi F, Körner M, Suárez J, Carozzi G, Meier VS, Roos M, Bley CR (2018) Computed tomographic-lymphography as a complementary technique for lymph node staging in dogs with malignant tumors of various sites. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 59:155-162.

Schaafsma, BE, Mieog JSD, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJK, Löwik, CWGM, Frangioni JV, van de Velde CJH, Vahrmeijer AL (2011) The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. **Journal of Surgical Oncology** 104:323-332.

Shayan R, Achen MG, Stacker SA (2006) Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. **Carcinogenesis** 27:1729-1738.

Silva P, Ramirez RAU et al. (2018) Ultrasonography for lymph nodes metastasis identification in bitches with mammary neoplasms, **Scientific Reports** 8:1-8.

Singhal S, Nie S, Wang MD (2010) Nanotechnology applications in surgical oncology. **Annual Review of Medicine** 61:359-373.

Singh B (2018) General Anatomy, Some Basic Facts and Concepts. In.: Dyce, Sack e Wensing's (Eds) **Textbook of Veterinary Anatomy**. St. Luis: Missouri, p. 22-69.

Skinner OT, Boston SE, Souza CHM (2017) Patterns of lymph node metastasis identified following bilateral mandibular and medial retrofaryngeal lymphadenectomy in 31 dogs with malignancies of the head. **Veterinary and Comparative Oncology** 15:881-889.

Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Derman M (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. **Nature Medicine** 7:192-198.

Sleeckx N, Van Brantegem L, Fransen E, Van den Eynden G, Casteleyn C, Veldhuis Kroeze E, Van Ginneken C (2013) Evaluation of immunohistochemical markers of lymphatic and blood vessels in canine mammary tumours. **Journal of Comparative Pathology** 148:307-317.

Sleeckx N, Van Brantegem L, Van den Eynden G, Fransen E, Casteleyn C, Van Cruchten S, Veldhuis Kroeze E, Van Ginneken C (2014) Lymphangiogenesis in canine mammary tumours: a morphometric and prognostic study. **Journal of Comparative Pathology** 150:184-193.

Soultani C, Paisikas M (2017) Assessment of sentinel lymph node metastasis in canine mammary gland tumors using computed tomographic indirect lymphography. **Veterinary Radiology & Ultrasound** 58:186-196.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. **Nature Medicine** 7:186-191.

Stoffels I, Dissemmond J, Pöppel T, Schadendorf D, Klode J (2015) Intraoperative fluorescence imaging for sentinel lymph node detection prospective clinical trial to compare the usefulness of indocyanine green vs technetium Tc 99m for identification of sentinel lymph nodes. **JAMA Surgery** 150:617-623.

Suami H, Yamashita S, Soto-Miranda M, Chang DW (2013) Lymphatic territories (lymphosomes) in a canine: an animal model for investigation of postoperative lymphatic alterations. **PLoS One** 8:1-9.

Tanaka E, Choi HS, Fujii H, Bawendi MG, Frangioni JV (2006) Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed preclinical development for sentinel lymph node mapping. **Annals of Surgical Oncology** 13:1671-1681.

Townsend KL, Milovancev M, Bracha S (2018) Feasibility of near-infrared fluorescence imaging for sentinel lymph node evaluation of the oral cavity in healthy dogs. **American Journal of Veterinary Association** 79:995-1000.

Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, Gioux SME, Matsui AMD, Oketokoun RMS, Ngo L, Khamene A, Azar F, Frangioni JV (2009) The FLARE™ intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping. **Annals of Surgical Oncology** 16:2943-2952.

Tuohy JL, Milgram J, Worley DR and Dernell WS (2009) A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. **Veterinary and Comparative Oncology** 7:81-91.

Wells S, Bennett A, Walsh P, Owens S, Peauroi J (2006) Clinical usefulness of intradermal fluorescein and patent blue violet dyes for sentinel lymph node identification in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 4:114-122.

Williams LE, Packer RA (2003) Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 222:1234-1236.

Worley DR (2014) Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. **Veterinary and Comparative Oncology** 15:215-226.

CAPÍTULO 2 – Mapeamento do linfonodo sentinela em tempo real por meio do sistema de imagem no infravermelho próximo (NIR) em cães com neoplasmas sólidos

J.L.G. Alvarez^a, A.B. Govone^b, T.R. Dreyer^b, W. Mion^b, A.B. De Nardi^a

^a Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Jaboticabal, Universidade do Estado de São Paulo (Unesp), Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Via de Acesso Professor Paulo Donato Catelane Castellane S/N – Vila Industrial, 14884-900.

^b Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidade de São Paulo (USP). São Carlos, São Paulo, Brasil.

Autor correspondência: endereço de e-mail: jorgeluisalgo@gmail.com

RESUMO

A detecção e biopsia excisional seletiva do linfonodo sentinela em cães com neoplasmas malignos que fazem metástase pela via linfática tem importância para estabelecer o estadiamento da doença, determinar o prognóstico e definir o tratamento. Para a marcação e consequente detecção do linfonodo sentinela, em tempo real, foi utilizado indocianina verde (ICV) e um protótipo de imagem no infravermelho próximo, respectivamente. Participaram do estudo 30 cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários. No pré-operatório, em 25 cães (83%) houve demarcação fluorescente transcutânea do trajeto linfático subcutâneo desde o local da injeção (peritumoral) da ICV em direção de um linfocentro regional. Em dezesseis cães (53,3%), os linfonodos marcados com indocianina verde foram reconhecidos antes da incisão cutânea. No período intraoperatório, 29 cães tinham marcação fluorescente dos linfonodos sentinela. Em nove cães (30%), o linfonodo sentinela não estava localizado no linfocentro regional mais próximo do tumor. Em cinco cães, os neoplasmas drenaram simultaneamente para dois linfocentros diferentes. Dois linfonodos axilares com macrometástase de carcinoma mamário não apresentaram fluorescência. Em nenhum paciente foram observadas reações adversas decorrentes da injeção local de ICV. Frente aos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, pode-se concluir que a curva de aprendizagem para realizar o mapeamento e detecção do linfonodo sentinela durante o pré-cirúrgico e no intraoperatório por meio do protótipo de imagem NIR é simples, rápida e segura.

PALAVRAS CHAVE

Linfocentro – indocianina verde – neoplasma mamário – neoplasmas cutâneos – linfadenectomia

* Este capítulo em formato de artigo foi escrito adotando as normas da revista Veterinary and Comparative Oncology.

1 | INTRODUÇÃO

Uma das características importantes no comportamento biológico do mastocitoma cutâneo canino¹⁻³, dos neoplasmas epiteliais malignos como os carcinomas mamários⁴⁻⁶, ou do melanoma maligno oral⁷, é a capacidade de disseminação metastática pela via linfática. Por esse motivo, durante o estadiamento clínico desses tipos de neoplasmas, a presença de metástase para o linfonodo é considerada um fator prognóstico.¹⁻⁷

Tradicionalmente, quando os linfonodos regionais superficiais mais próximos do neoplasma primário apresentam anormalidades durante a palpação, são coletadas amostras para avaliação citopatológica com o intuito de detectar células metastáticas. Porém, nem sempre os linfonodos regionais de tamanho anormal apresentam metástases na avaliação citopatológica ou histopatológica^{8,9} e, em alguns casos o resultado histopatológico pode ser de hiperplasia reativa.⁸ Recentemente, um estudo retrospectivo demonstrou que linfonodos regionais não palpáveis ou de tamanho normal tinham metástase microscópica em 50 % dos cães com mastocitoma cutâneo.¹⁰ Ainda mais, nem sempre o linfonodo regional ipsilateral ou mais próximos do neoplasma primário são os que recebem a drenagem linfática,^{9, 11-13} as vezes dependendo da localização anatômica do neoplasma, mais de um linfocentro pode abrigar células metastáticas.^{9,14} Assim sendo, além das variações anatômicas existentes no sistema linfático entre os cães,^{15,16} a possível reorganização dos canais linfáticos e da vascularização no linfonodo sentinela iniciada por um neoplasma primário,^{17,18} justificam o mapeamento do linfonodo sentinela, apontado à linfadenectomia seletiva com o menor trauma local possível. Morton et al.¹⁹ definiram como linfonodo sentinela o primeiro linfonodo que recebe a drenagem linfática procedente do neoplasma primário. Em teoria, a presença ou ausência de metástase no linfonodo sentinela reflete o status dos linfonodos remanescentes numa bacia linfática regional.^{20,21,22}

Há uma década, várias técnicas invasivas e não invasivas foram reportadas para o mapeamento do linfonodo sentinela em oncologia veterinária.^{23,24} Todavia, de forma semelhante ao que acontece em oncologia humana, a técnica padrão para a detecção do linfonodo sentinela é a linfocintilografia quando comparada com marcadores colorimétricos como azul patente V 2,5%^{25,26} ou azul de metileno.¹¹ Porém, essa técnica de mapeamento não é frequentemente aplicável na rotina cirúrgica veterinária por causa dos custos de cada procedimento e da necessidade de instalações especiais para o uso de materiais radioativos.^{11,24,27} Os métodos colorimétricos são uma excelente alternativa para a visualização intraoperatória (percutânea) do linfonodo sentinela,²⁸ além de serem relativamente seguros, já que não foram reportadas reações alérgicas em vários estudos em cães.^{11,12,25,26,28} Por esses motivos, são utilizados frequentemente, embora a sensibilidade dos métodos colorimétricos é menor em relação à linfocintilografia,^{11,25,26} linfografia radiográfica indireta¹² ou imagem no infravermelho próximo com ICV.²²

No que se refere à linfografia radiográfica indireta, é uma técnica de mapeamento do linfonodo sentinela que se realiza no pré-operatório, em duas fases de tempo.¹² Na primeira fase é realizada a injeção peritumoral do marcador (Lipiodol®) e, na segunda fase, 24 horas após é realizado um estudo radiográfico, em duas vistas ortogonais. Essa técnica é de grande valor diagnóstico para a detecção dos linfonodos sentinelas localizados em locais profundos, porém no

transoperatório, para o fácil reconhecimento visual do linfonodo sentinela é requerido um corante vital.¹²

A fluorescência no infravermelho próximo (NIR), é uma técnica de imagem óptica, não invasiva, que fornece imagens visíveis ao olho humano (400 – 700 nm) assim que a fonte de luz NIR invisível entra em contato e excita um fluoróforo NIR exógeno que também atua na faixa espectral invisível (650 a 900 nm) denominada infravermelho próximo.²⁹⁻³¹ Nessa janela óptica, o coeficiente de absorção da luz pelos tecidos e a dispersão de fótons são mínimos, promovendo imagens NIR com contraste favorável para avaliação em tempo real.^{29,32} Segundo Hirche et al.³¹ um fluoróforo NIR é um composto químico que converte a luz NIR de um comprimento de onda em luz NIR de comprimento de onda diferente (Stokes shift),³⁰ que posteriormente é detectado e mostra por meio de uma câmera NIR imagens da localização, em tempo real, do alvo no campo cirúrgico.³³ Atualmente, o único fluoróforo fluorescente NIR aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico em pessoas é a indocianina verde (ICV).³⁴ Este fluoróforo é uma sonda orgânica, não direcionada, pertencente ao grupo das tricarbocianinas, com comprimento de onda de excitação de 778 nm e pico de emissão de 820 - 830 nm no plasma, metabolizada exclusivamente pelo fígado.^{34,35} A fonte de luz de excitação NIR pode proceder de diodos laser, diodos emissores de luz (LEDs) ou lâmpadas de banda larga que, junto com os filtros de emissão, o tipo de câmera de fluorescência e outros componentes técnicos, marcam diferenças entre os sistemas de imagem NIR disponíveis comercialmente para uso cirúrgico.^{36,37}

O uso do corante ICV junto com a imagem NIR foram propostas em cirurgia oncológica humana para avaliar, em tempo real, a extensão das margens cirúrgicas dos neoplasmas sólidos,^{33,34} e para angiografia intraoperatória em cirurgia reconstrutiva.^{33,34,38} Além disso, atualmente pela alta sensibilidade, esta técnica é amplamente utilizada no mapeamento e biopsia guiada do linfonodo sentinela em câncer de mama,^{22,39} no melanoma maligno cutâneo,⁴⁰ e em outros neoplasmas intracavitários.^{41,42} Em pessoas também foi demonstrada a contribuição da linfografia fluorescente com ICV no diagnóstico do linfedema.¹³

A maior parte da indocianina verde injetada se liga à albumina e, devido ao alto conteúdo proteico da linfa a ICV acumula-se nos vasos linfáticos que a drenam para os linfonodos.^{33,34,41} Por esse motivo, por meio do sistema de imagem NIR os vasos linfáticos subcutâneos que drenam a ICV podem ser detectados, em tempo real, como linhas fluorescentes na pele e, o ponto em que os vasos linfáticos drenam é o linfonodo sentinela.^{40,41} Estudos realizados em pessoas relatam que podem ocorrer reações adversas fatais em 1:10.000 a 1:100.000 após injeção endovenosa.⁴³ A dose de ICV varia amplamente segundo a via de administração e o objetivo de cada estudo.³³ Em doses que oscilam entre 0,1mg a 0,5mg/kg a porcentagem de reações alérgicas parecem ser baixas (0,005%).³⁴ Da mesma forma que em humanos, em cães a ICV é segura, e não foram relatadas reações adversas após a sua administração endovenosa na dose de 0,5 mg/kg⁴⁴ ou de 1mg/kg^{45,46} ou após injeção na submucosa oral, ou via intradérmica na concentração de 0,5mg/mL.^{47,48}

A nossa hipótese foi que após a injeção intradérmica e peritumoral de indocianina verde o protótipo de imagem no infravermelho próximo facilita o reconhecimento visual transcutâneo fluorescente dos vasos linfáticos e do linfonodo sentinela correspondente, em tempo real, tanto no período pré-operatório e

intraoperatório, em cães com neoplasmas sólidos cutâneos ou mamários. Os objetivos deste estudo foram: determinar a aplicabilidade de um protótipo de imagem NIR para mapeamento transcutâneo e percutâneo do linfonodo sentinela; avaliar a técnica de imagem NIR associada a indocianina verde para marcação e detecção do linfonodo sentinela em cães com neoplasmas sólidos cutâneos e mamários.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo clínico prospectivo não randomizado, foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCAV), protocolo número 011029/18 da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. O ensaio clínico foi realizado em cães de clientes do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-Unesp, após consentimento informado e assinado pelo tutor.

2.1 Animais

Os cães foram selecionados após o estadiamento clínico do neoplasma, realização de exame físico geral, hemograma, perfil bioquímico sérico, ultrassom abdominal, estudo radiográfico de tórax em três projeções diferentes e prévio estudo citopatológico dos tumores cutâneos. Os critérios de inclusão foram cães machos ou fêmeas, de qualquer peso, idade ou raça, que apresentaram neoplasmas malignos sólidos cutâneos ou neoplasmas mamários malignos, primários ou recidiva, considerados eletivos para remoção cirúrgica e biopsia excisional do linfonodo sentinela e do linfonodo regional mais próximo do tumor. Não foi realizada análise citopatológica prévia dos linfonodos em nenhum paciente com intuito de evitar interferência na tomada de decisões durante o mapeamento do linfonodo sentinela. Os critérios de exclusão foram cães com neoplasmas benignos, cães com metástase pulmonar e/ou com sinais de metástase em órgãos intra-abdominais, bem como cães com neoplasmas malignos com impossibilidade de ressecção dos linfonodos regionais.

2.2 Indocianina verde

A indocianina verde (ICV, Ophthalmos S.A. Jabaquara-São Paulo, Brasil) frasco-ampola com 5 mg na forma de pó liofilizado foi diluída em 10 mL de água de injeção, produzindo uma concentração final de 0,5mg/mL. Após diluição, a solução foi utilizada até 48 horas após a sua preparação, permanecendo protegida da exposição à luz e em temperatura ambiente.

2.3 Protótipo de imagem de fluorescência no infravermelho próximo

Para o presente ensaio clínico, a excitação do fluoróforo ICV e consequente detecção do sinal fluorescente durante o mapeamento do linfonodo sentinela, foi desenvolvido um protótipo portátil de imagem de fluorescência no infravermelho próximo. O sistema desenvolvido conta com um conjunto de diodos emissores de luz (LEDs) alimentado com fonte limitada em corrente a 350 mA gerando tensão

aproximada de 1,9V por LED. Os LEDs consomem 1W elétrico com rendimento óptico de 60% e emitem luz em 780 +/- 10nm. Essa banda é absorvida pela ICV, gerando fluorescência na região dos 850nm. Dessa forma, uma câmera analógica CCD (Intelbras, Brasil) de 420 linhas foi utilizada para captura das imagens provenientes da região irradiada. A câmera foi desmontada e os filtros originais foram substituídos por filtros passa alta, com corte em 810nm. Dessa forma, a região de excitação da amostra foi barrada e apenas a fluorescência emitida pelo ICV foi transmitida pelo filtro, chegando ao sensor da câmera para captura da imagem. A imagem capturada foi enviada para um monitor de 10 polegadas, fiada ao conjunto óptico para análise em tempo real. Todo o sistema foi alimentado por uma fonte colmeia Intelbras de 12V, 5A e conjuntos retificadores para os LEDs e câmera.

2.3 Mapeamento do linfonodo sentinela

Após a sedação dos animais, realizou-se ampla tricotomia da região ventral do tórax e do abdômen nos cães com neoplasmas mamários ou, da região corporal específica onde se localizavam os neoplasmas cutâneos e possíveis regiões de drenagem linfática. Os linfonodos regionais superficiais para onde possivelmente o neoplasma podia drenar foram palpados e classificados segundo o tamanho em linfonodo não palpável, linfonodo normal e em linfonodo aumentado. Também, quando possível foi avaliado por meio da ultrassonografia modo B a profundidade dos linfonodos axilares e inguinais em relação à superfície cutânea. Após anestesia do paciente anestesiado, conforme os protocolos do serviço de anestesiologia do Hospital Veterinário, os cães com neoplasma mamário ou com neoplasmas cutâneos foram posicionadas em decúbito dorsal. Entretanto, os cães com neoplasmas cutâneos em cabeça, pescoço ou em membros, foram posicionados de uma maneira que a avaliação transcutânea da drenagem linfática para o linfonodo(s) sentinela(s) fosse realizada constantemente, antes e durante a biopsia excisional.

Após a correspondente antissepsia do campo cirúrgico, em seguida, com auxílio de uma seringa de 1 mL e uma agulha de calibre 27 G, foi injetado lentamente um volume de 0,025 mL a 0,05 mL da solução de 0,5mg/mL de ICV, em cada quadrante (mínimo 4 quadrantes) por via intradérmica, na área peritumoral. Imediatamente após a injeção de ICV, foi realizada durante sessenta segundos, massagem delicada no local da injeção, com o intuito de estimular a absorção e consequente drenagem da ICV através dos canais linfáticos até o linfonodo sentinela. Ato contínuo, com auxílio do protótipo portátil de imagem NIR, foram procurados sinais de fluorescência transcutânea, procedentes da ICV drenada (em tempo real) através dos capilares e vasos linfáticos desde o seu local de injeção (peritumoral) em direção do LS correspondente. O protótipo NIR foi posicionado a uma distância (altura) que oscilava entre 15 cm a 20 cm sobre a região dos neoplasmas cutâneos ou mamários e dos linfocentros regionais. Foi registrado o tempo exato da injeção da ICV e o tempo de aparição do sinal fluorescente transcutâneo, tanto dos vasos linfáticos e/ou do linfonodo marcado (linfonodo sentinela) em cada um dos cães. Posteriormente, foi desenhado na pele, com uma caneta demográfica, os sinais fluorescentes do trajeto linfático (padrão linear direcionado) e dos linfocentros correspondentes, permanecendo um guia visual para a incisão cutânea e avaliação percutânea. Nos casos que não apresentavam sinais de fluorescência transcutânea

do trajeto linfático o tempo máximo de espera foram 30 minutos para continuar com a avaliação percutânea dos linfocentros regionais.

Após proteção do campo operatório, foi realizada a avaliação percutânea guiada pelo protótipo de imagem NIR através de uma incisão cutânea de três a quatro cm nos linfocentros marcados pela ICV e nos linfocentros regionais não marcados, mas que ficavam próximos do neoplasma. Ato contínuo, foi realizado a remoção cirúrgica dos neoplasmas mamários ou cutâneos, respeitando o princípio das margens de segurança segundo o tipo histológico. Em alguns casos, quando o linfonodo (axilar, retrofaríngeo ou cervical) se localizava numa posição profunda, foi requerida divulsão romba do tecido subcutâneo e adiposo, ou do músculo sobreposto ao linfonodo para localizar o sinal fluorescente da indocianina no linfonodo. Em cada paciente foi realizada biopsia excisional dos linfonodos regionais fluorescentes (LS) e dos linfonodos regionais não fluorescentes (LNS) localizados em dois linfocentros regionais diferentes, e posterior avaliação histopatológica. Em todos os cães, a injeção da ICV e a técnica de mapeamento do linfonodo sentinela por meio do protótipo de imagem NIR foi realizado pelo mesmo avaliador. Um registro de observações gerais para cada paciente foi mantido no transoperatório e no pós-operatório imediato, mediato e tardio.

2.4 Estudo histopatológico

Todos os linfonodos fluorescentes (LS) e linfonodos não fluorescentes (linfonodos regionais não sentinelas), incluindo os neoplasmas cutâneos e mamários, foram coletados imediatamente após remoção cirúrgica e fixados em formalina tamponada a 10% durante 48 horas, posteriormente as amostras foram armazenadas em álcool a 70% até o momento do processamento histológico. As amostras dos neoplasmas foram processadas, através da inclusão em parafina, seguido de cortes de 5µ de espessura e coloração com Hematoxilina e Eosina. Os cortes histológicos dos linfonodos foram realizados conforme à metodologia vigente.⁴⁹ O estudo histopatológico de rotina em microscópio de luz foi realizado para estabelecer a graduação e classificação histopatológica dos neoplasmas mamários bem como a presença de metástase nos linfonodos excisionados.⁵⁰ Da mesma forma, os neoplasmas cutâneos foram graduados e classificados de acordo com o sistema correspondente para cada tipo histológico.^{51,52} As amostras de mastocitoma cutâneo foram classificados de acordo com o sistema Kiupel et al.⁵³ e Patnaik et al.⁵⁴ e para a detecção de metástase nos linfonodos foi utilizada a classificação proposta por Weishaar et al.⁵⁵

2.5 Análise estatística

As frequências de fluorescência (TL: trajeto linfático; LS: linfonodo sentinela), a palpação do linfonodo e as metástases por grupo (NMM: neoplasia maligna mamária; NMC: neoplasia maligna cutânea) foram comparadas pelo teste de proporções. Para determinar a associação e variação total entre a localização tumoral e o linfonodo sentinela foi utilizada a análise multivariada de correspondência. Para a análise estatística foi utilizado o R Core Team (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria, 2019) e STATSOFT. Statistical: data analysis software system. Version 7. Tulsa, OK: Statsoft Inc., 2004.

3 | RESULTADOS

Neste estudo foram selecionados um total de trinta cães, sendo quinze fêmeas castradas, doze fêmeas intactas, dois machos intactos e um macho castrado. A idade dos cães variou entre um e dezesseis anos (média 10.4 anos). O peso variou de 4.6 kg a 34.7 kg (média 16.8kg). Entre as raças, houveram 16 cães sem raça definida, 4 American Pit bull, 2 Boxers, 2 Golden Retrievers, 2 York Shire, 1 Beagle, 1 Poodle, 1 Pug, 1 Dachshund.

Em relação à localização anatômica dos neoplasmas, seis cães apresentaram neoplasmas na região proximal (três casos) ou na região distal (três casos) dos membros torácicos. Nesses seis pacientes, os neoplasmas drenaram (fluorescência transcutânea do trajeto) para o linfonodo cervical superficial ipsilateral. No entanto, um cão que apresentava carcinoma de células escamosas (CEC) em região palmar do carpo, também drenou simultaneamente para o linfonodo axilar (Figura 1). Em cinco linfonodos cervicais havia fluorescência transcutânea, três deles tinham tamanho aumentado, e um com metástase de mastocitoma cutâneo (MCT) baixo grau/grau II.

Em cinco cães os neoplasmas estavam localizados nos membros pélvicos. Um hemangiossarcoma cutâneo (HSA) presente na face medial da tibia drenou para o linfonodo inguinal superficial, o qual tinha tamanho normal, porém com metástase do HSA cutâneo. Um sarcoma de partes moles grau I (STS) em região látero-medial do fêmur drenou para o linfonodo inguinal superficial (tamanho normal). Um mastocitoma baixo grau/grau II em região plantar do tarso drenou para o linfonodo poplíteo (aumentado), apresentando metástase. Esses três casos tinham fluorescência transcutânea do trajeto linfático e do respectivo linfonodo sentinela. Em outro cão que tinha MCT de alto grau/grau II no ísquio não foram detectadas a drenagem linfática e o linfonodo sentinela, apenas havia fluorescência no local da injeção da ICV. Também não foi identificado o trajeto linfático em outro cão que também apresentava MCT de alto grau/grau II em face medial femoral, mas na avaliação percutânea tinha fluorescência em apenas uma pequena parte do linfonodo inguinal superficial (de tamanho aumentado), com metástase na avaliação histopatológica.

Dois cães apresentavam neoplasmas cutâneos em região abdominal caudal, um deles tinha HSA cutâneo e drenou para o linfonodo inguinal superficial (fluorescência percutânea). Entretanto, no segundo caso que tinha CEC e HSA cutâneo entre as glândulas mamárias abdominais, os neoplasmas drenaram simultaneamente para os linfonodos inguinais superficiais (fluorescência percutânea) e para o linfonodo axilar (fluorescência percutânea). Os dois casos tinham fluorescência transcutânea do trajeto linfático. O tamanho dos linfonodos inguinais estava aumentado, mas no estudo histopatológico não possuíam metástase.

Dois cães manifestaram recidiva de MCT cutâneo de alto grau/grau II na região da base da orelha. No primeiro caso, o neoplasma drenou apenas para o linfonodo retrofaríngeo medial (fluorescência percutânea) (Figura 2), não detectado na palpação. No segundo caso, drenou somente no linfonodo cervical superficial de tamanho normal (fluorescência percutânea). Ambos os linfonodos fluorescentes tinham metástases. Nesses cães, a fluorescência transcutânea do trajeto linfático e do linfonodo sentinela não foi detectada.

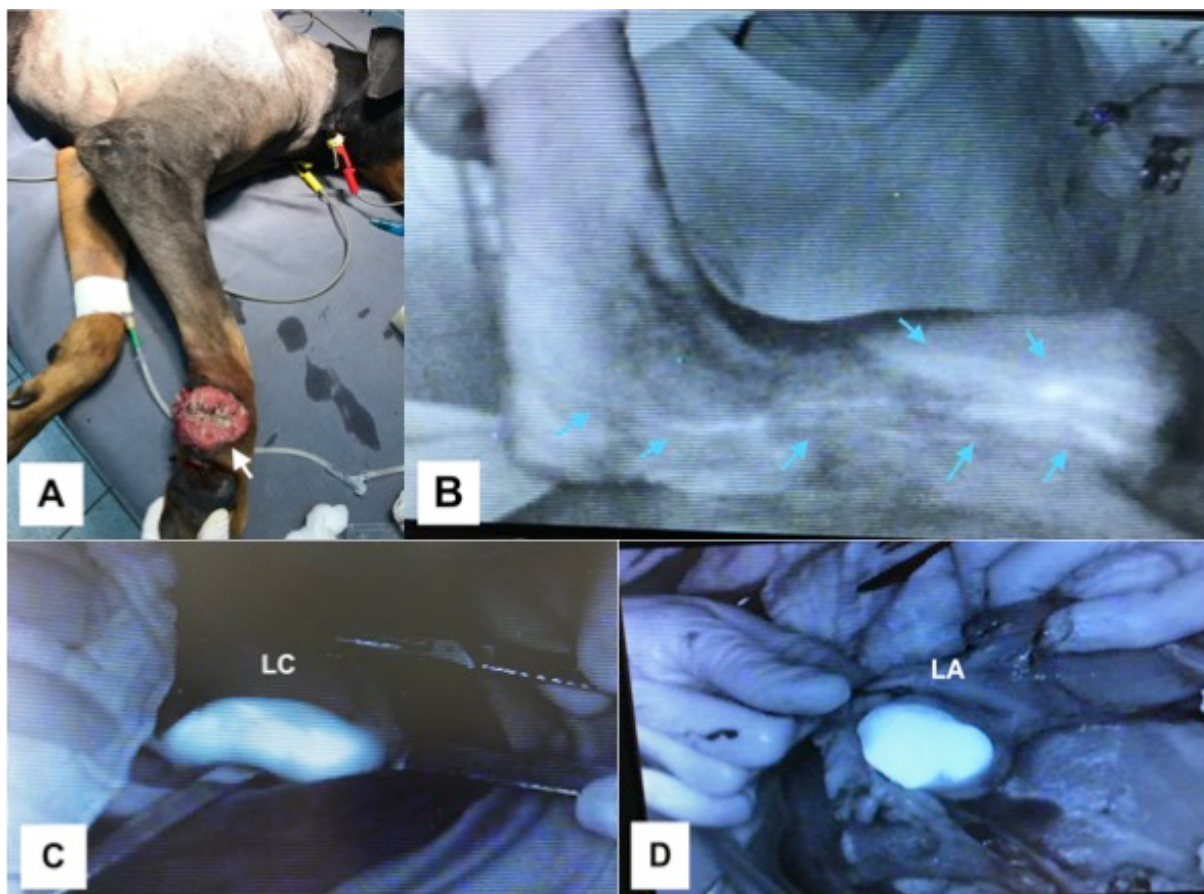


FIGURA 1 Imagens fotográficas de um cão com carcinoma de células escamosas localizado na região palmar do carpo. (A) A seta branca mostra os locais da injeção da ICV. (B) Imagem NIR, as setas azuis mostram a fluorescência transcutânea dos canais linfáticos subcutâneos na face medial do membro torácico direito. (C) Imagem NIR do linfonodo cervical superficial ipsilateral fluorescente. (D) Imagem NIR do linfonodo axilar ipsilateral apresentando fluorescência durante a avaliação percutânea

Duas cadelas apresentaram neoplasma na glândula mamária torácica caudal (M2). Nos dois casos, os tumores drenaram (fluorescência transcutâneo do trajeto linfático) para o respectivo linfonodo axilar ipsilateral (não palpáveis), aparecendo fluorescentes durante a avaliação percutânea (Figura 3). Outras duas cadelas tinham neoplasma na glândula mamária abdominal cranial (M3). A fluorescência transcutânea dos trajetos linfáticos subcutâneos foi observada. No primeiro caso, um carcinoma misto grau II drenou somente para o linfocentro inguinal superficial ipsilateral que tinha dois linfonodos, de tamanho normal/não palpável, mostrando fluorescência apenas na avaliação percutânea. No segundo caso, um carcinoma mamário papilífero grau III drenou simultaneamente para o linfocentro axilar e inguinal superficial. No linfocentro axilar foram detectados dois linfonodos, um axilar próprio (não palpável) sem sinais de fluorescência na avaliação percutânea, e um axilar acessório mais superficial (não palpável), mas mostrando fluorescência. Os dois linfonodos da região axilar e um linfonodo inguinal superficial (tamanho aumentado) tinham metástase.

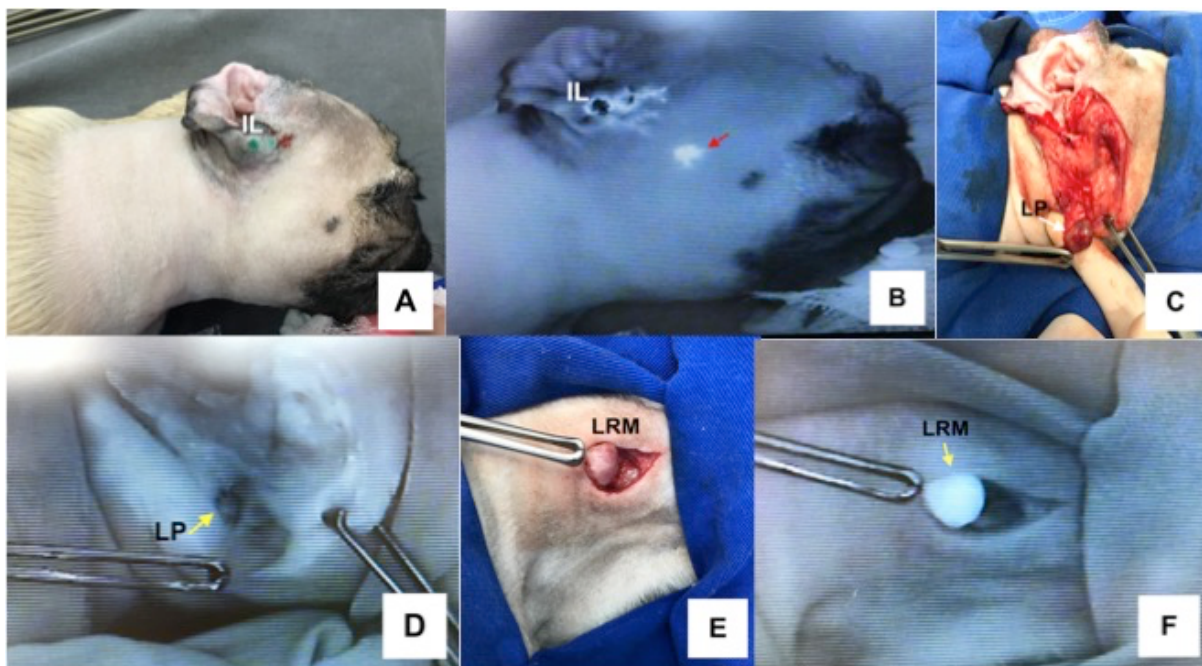


FIGURA 2 Imagens fotográficas de uma cadela com recidiva de mastocitoma cutâneo alto grau/grau II na base da orelha direita. (A) IL mostra o local de injeção da ICV na região peritumoral. (B) Imagem NIR, a seta vermelha mostra uma mancha cutânea (erro) com ICV na face, o trajeto linfático e o linfonodo não foram detectados. (C) LP ou linfonodo parotídeo esquerdo de tamanho normal. (D) Imagem NIR do linfonodo parotídeo sem fluorescência na avaliação percutânea. (E) Incisão cutânea na região ventral do pescoço para avaliação do linfonodo retrofaríngeo medial LRM. (F) Imagem NIR demonstrando fluorescência do LRM na avaliação percutânea

Sete cadelas apresentaram neoplasmas na glândula abdominal caudal (M4). Em dois casos a drenagem linfática foi simultaneamente para os linfocentros axilar e inguinal superficial. Um desses casos tinha carcinoma mamário papilífero grau III, o linfonodo axilar (não palpável) não apresentava fluorescência transcutânea ou percutânea, embora no estudo histopatológico o linfonodo axilar e inguinal (tamanho aumentado) evidenciassem macrometástase. Nesse mesmo caso, o trajeto linfático subcutâneo fluorescente manifestou padrão difuso cutâneo em direção da região axilar (Figura 4). No segundo caso, carcinoma papilar grau I e carcinoma em tumor misto grau I, na avaliação transcutânea houve fluorescência do trajeto linfático só em direção axilar, mas na avaliação percutânea apresentou fluorescência no linfonodo axilar (não palpável) e inguinal (normal), simultaneamente com macrometástase. Nos restantes cinco casos os neoplasmas drenaram apenas para o linfocentro inguinal superficial ipsilateral. Em dois cães os linfonodos inguinais tiveram tamanho normal/não palpável e em três cães os linfonodos estavam aumentados de tamanho, um deles tinha metástases.

Por fim, quatro cadelas apresentaram neoplasmas na glândula mamária inguinal (M5), todos os neoplasmas drenaram para o linfocentro inguinal superficial. Em três casos houve fluorescência transcutânea dos linfonodos inguinais. Nenhum desses quatro casos tinham metástase em linfonodos. Em um cão houve um trajeto

curto, brilhante, desde o ponto de injeção da ICV até o linfonodo inguinal no parênquima da glândula mamária M5 contralateral.

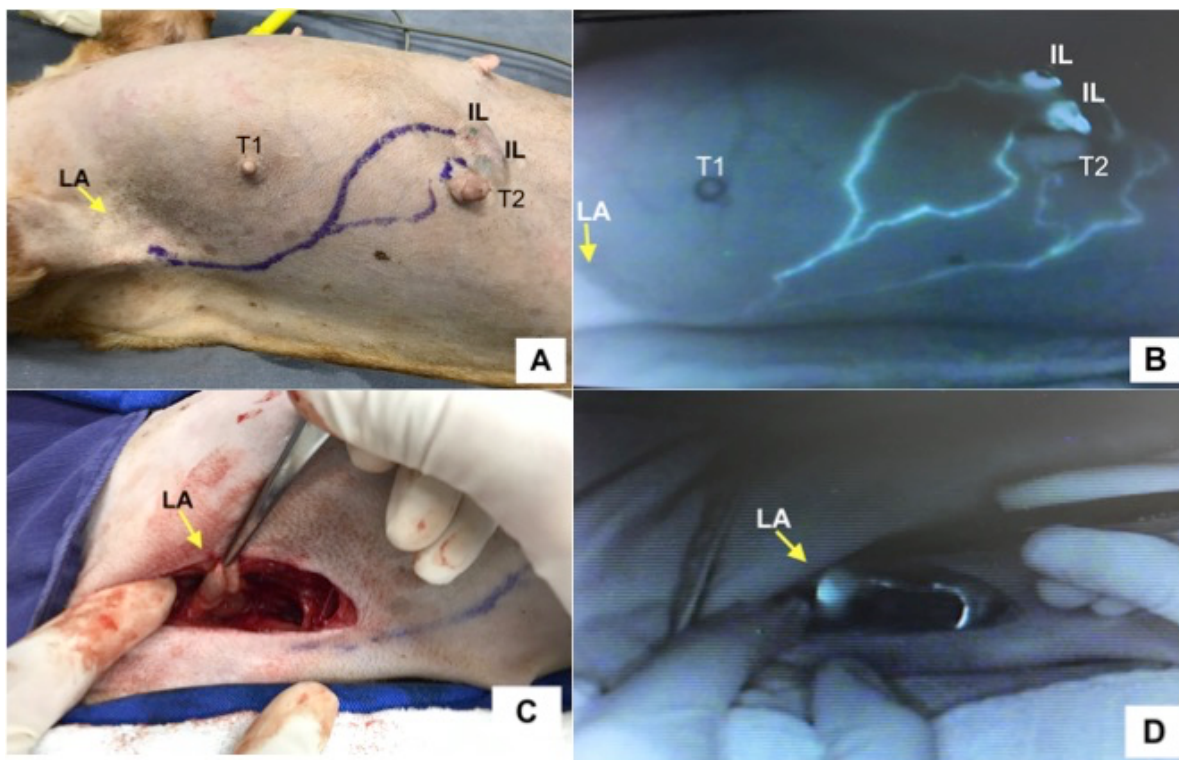


FIGURA 3 Imagens fotográficas de uma cadela com carcinoma mamário misto grau II. na glândula mamária torácica caudal esquerda ou T2. (A) A seta amarela mostra a localização do linfonodo axilar (LA). IL são os locais de injeção intradérmica com ICV em T2. (B) Imagem NIR demonstrando a fluorescência transcutânea do trajeto dos vasos linfático desde M2 à região axilar ipsilateral. (C) Incisão cutânea na região axilar e exposição do linfonodo axilar ipsilateral. (D) Imagem NIR da fluorescência percutânea do linfonodo axilar esquerdo (seta amarela).

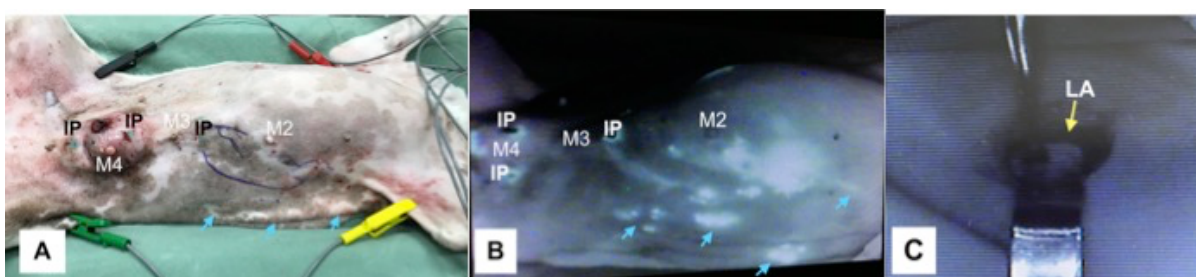


FIGURA 4 Imagens fotográficas de uma cadela com carcinoma papilífero grau III na glândula mamária abdominal caudal M4. (A) Os pontos de injeção ou IP com ICV foram realizados em M4 e em M3. (B) Imagem NIR fluorescente transcutânea do trajeto linfático subcutâneo, em padrão difuso; as setas azuis apontam os pontos brilhantes em diferentes locais em direção da região axilar. (C) Imagem NIR da avaliação percutânea do linfonodo axilar, LA seta amarela, sem sinal fluorescente

Durante a avaliação transcutânea foi visível o trajeto linfático subcutâneo em 14/15 cadelas (93,3%) com neoplasmas mamários. Em seis casos o sinal

fluorescente transcutâneo foi discreto e entrecortado na região entre M4 e M5. Somente em oito de quinze cadelas (53.3%) foram identificados os linfonodos inguinais na avaliação transcutânea. O intervalo de tempo entre a aplicação da ICV e a observação da fluorescência transcutânea variou entre 2 min – 18 min (média de 6,5 min). De trinta linfocentros foram coletados 39 linfonodos (16 axilares e 23 inguinais). Doze linfonodos inguinais superficiais e um linfonodo acessório axilar apresentavam fluorescência transcutânea (Tabela 1). Já na avaliação percutânea houve fluorescência em dezenove linfonodos inguinais e em quatro linfonodos axilares (Tabela 1 e 2). No estudo histopatológico foi identificado metástase em sete linfonodos marcados com ICV e em dois linfonodos axilares não fluorescentes (Tabela 2).

TABELA 1 Proporções da fluorescência transcutânea do trajeto linfático e da fluorescência transcutânea e percutânea dos linfonodos avaliados por imagem NIR em 15 cadelas com neoplasmas mamários malignos (n=39 linfonodos)

		Fluorescência LM (+)		Fluorescência LM (-)	
		Transcutânea	Percutânea	Transcutânea	Percutânea
Fluorescência TL	Ausente	0/0	(3/23 LS)	(14/16 LNS)	(14/16 LNF)
	Presente	(13/23 LS)	(20/23 LS)*	(2/16 LNS)	(2/16 LNF)

LM(+): linfonodo marcado com ICV positivo, LM(-): linfonodo não marcado com ICV negativo, LS: linfonodo sentinela, LNS: linfonodo não sentinela, TL: trajeto linfático transcutâneo. * diferença significativa entre categorias transcutânea-percutânea.

TABELA 2 Proporções dos linfonodos sentinelas, palpação e metástases no grupo neoplasmas mamários malignos em 15 cadelas avaliadas por imagem NIR (n=39 linfonodos)

Marcador (NIR)		Histopatológico (metástase)					
		+			-		
			N/NP	A		N/NP	A
+	+	7/23 (LF)	3/7	4/7	16/23 (LF)*	13/16	3/16**
	-	2/16 (LNF)	2/2	0/2	14/16 (LNF)*	14/14	0/14**

LF: linfonodo fluorescente (sentinela), LNF: linfonodo não fluorescente (não sentinela), N: normal, NP: não palpável, A: aumentado. * diferença significativa entre categoria NIR (+ ou -), ** diferença significativa entre categoria não palpável/normal N/NP-A.

Em relação aos neoplasmas cutâneos, em 11 de 15 cães (73,3%) foi visível a fluorescência transcutânea do trajeto dos vasos linfáticos em direção ao linfonodo sentinela; porém, só em oito cães (53.3%) havia fluorescência transcutânea do linfonodo sentinela marcado com ICV. Em quatro dos quinze cães (26,7%), o trajeto linfático transcutâneo não foi detectado (Tabela 3). O intervalo de tempo para

identificar o sinal de fluorescência dos trajetos linfáticos foi de 3 min a 13 min, com média de 8,8 min. A avaliação percutânea foi realizada em trinta linfocentros, obtendo por biópsia excisional 30 linfonodos (2 parotídeos, 1 retrofaríngeo, 7 cervicais, 8 axilares, 5 poplíteos e 7 inguinais). Em dezesseis linfonodos houve fluorescência percutânea, e quatorze linfonodos não apresentaram fluorescência. No estudo histopatológico, seis linfonodos marcados com ICV tiveram metástase (Tabela 4).

TABELA 3 Proporções da fluorescência transcutânea do trajeto linfático e da fluorescência transcutânea e percutânea dos linfonodos avaliados por imagem NIR em 15 cães com neoplasmas cutâneos malignos (n=30 linfonodos)

Fluorescência TL	Fluorescência LM (+)			Fluorescência LM (-)	
	Transcutânea		Percutânea	Transcutânea	Percutânea
	Ausente	0/0	(4/16 LS)	(14/14 LNS)	(14/14 LNS)
	Presente	(8/16 LS)	(12/16 LS)	0/0	0/0

LM(+): linfonodo marcado positivo, LM(-): linfonodo marcado negativo, LS: linfonodo sentinela, LNS: linfonodo não sentinela, TL: trajeto linfático.

TABELA 4 Proporções dos linfonodos sentinelas, palpação e metástases no grupo neoplasmas cutâneos malignos em 15 cadelas avaliadas por imagem NIR (n=30 linfonodos)

Marcador (NIR)		Histopatológico (metástase)				
		+			-	
		N/NP	A		N/NP	A
+	+	6/16 (LF)	3/6	3/6	10/16 (LF)	5/10
	-	0/14 (LNF)	0/0	0/0	14/14 (LNF)*	0/14**

LF: linfonodo fluorescente (sentinela), LNF: linfonodo não fluorescente (não sentinela), N: normal, NP: não palpável, A: aumentado. * diferença significativa entre categoria NIR (+ ou -), ** diferença significativa entre categoria N/NP-A.

No geral, de 30 cães com neoplasmas cutâneos ou mamários, em cinco casos (17,7%) não foi identificado a fluorescência transcutânea do trajeto linfático subcutâneo por meio do protótipo de imagem NIR. Em 25 cães (83,3%) foi possível a detecção do trajeto linfático em direção do LS num intervalo de tempo de 2 a 18 min (média de 8,8min). Durante a avaliação percutânea guiada pelo protótipo de imagem NIR, 39/69 linfonodos apresentaram fluorescência. No estudo histopatológico, 15/69 linfonodos tiveram metástase (onze cães), dos quais 13/15 evidenciaram marcação fluorescente e 2/15 não apresentaram fluorescência.

Considerando o resultado histopatológico e marcação fluorescente, linfonodos sentinelas foram 41/69 e linfonodos regionais foram 28/69. Na palpação, dos 15 linfonodos sentinelas com metástase, sete apresentavam tamanho aumentado e oito

foram referidos como normais/não palpáveis. Dos 26 linfonodos sentinelas sem metástase, 18/26 tinham tamanho normal/não palpável e 8/26 tinham tamanho aumentado. Em nove dos trinta (30%) cães o linfonodo sentinela não estava localizado no linfocentro regional mais próximo do neoplasma. Em cinco cães (16,7%) os neoplasmas drenaram simultaneamente para dois linfocentros regionais diferentes.

Na análise de correspondência múltipla entre o tamanho dos linfonodos, linfonodos regionais, linfonodos sentinelas e metástase em linfonodo, houve correlação significativa ($p < 0,05$) entre linfonodos não palpáveis e linfonodos regionais. Também houve correspondência significativa entre linfonodo sentinela, tamanho aumentado e metástase. Em relação à localização dos neoplasmas em membros torácicos houve associação com o linfonodo cervical superficial (Figura 5).

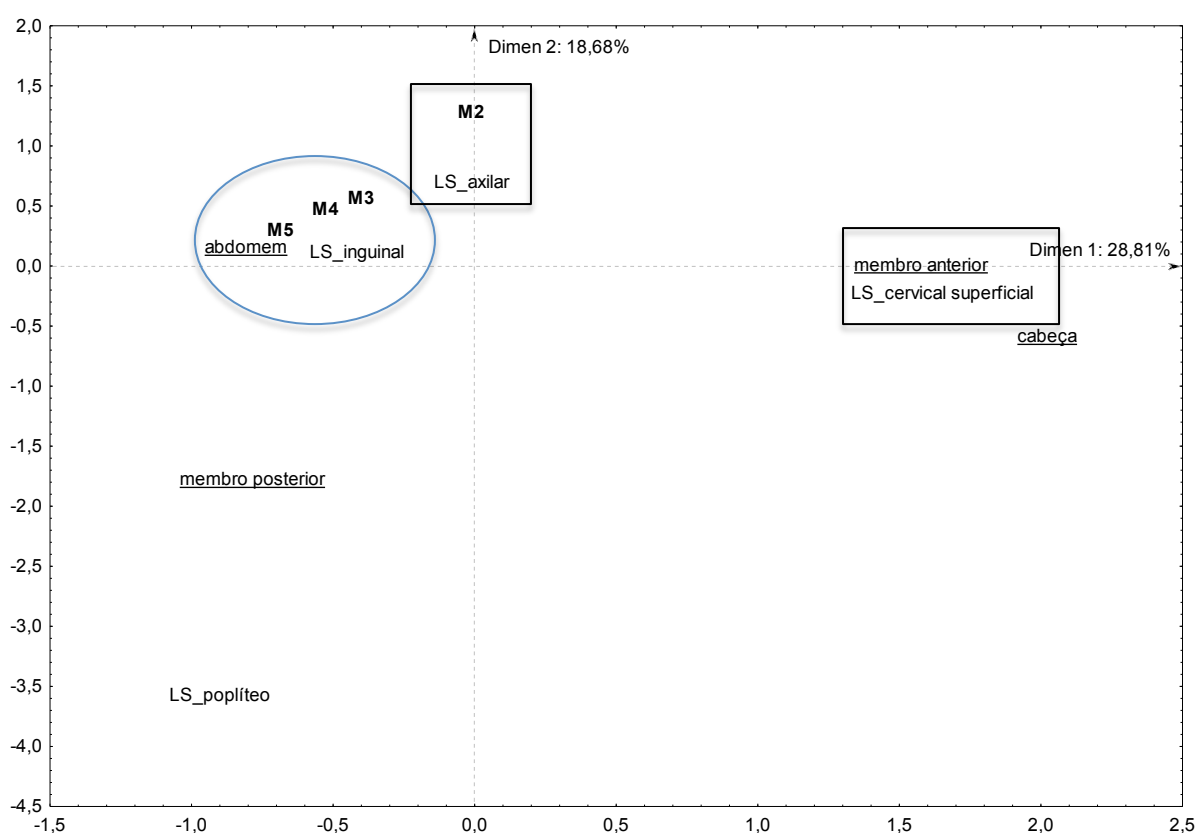


FIGURA 5 Análise de correspondências múltiplas da localização dos neoplasmas versus linfonodo sentinela (LS). Houve uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre a drenagem linfática dos neoplasmas localizados nos membros torácicos e o linfonodo cervical superficial ipsilateral. Também houve correlação significativa entre a drenagem dos neoplasmas em M2 com o linfonodo axilar. Embora as frequências presentes no círculo azul apresentassem correlação, não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Por outro lado, foi realizada análise de correspondência múltipla entre a sequência da fluorescência do trajeto linfático e a espessura da camada de gordura subcutânea. Em 12 cães a camada subcutânea foi < 5 mm de espessura (espessura fina), nove cães apresentaram uma espessura entre 6 – 10 mm (espessura média) e

nove cães tiveram uma espessura $>10\text{mm}$ (espessura grossa). Houve uma correspondência significativa ($p<0,05$) entre fluorescência parcial do trajeto linfático e uma espessura grossa do tecido subcutâneo. Por meio da ultrassonografia em modo B foi possível detectar a profundidade dos linfonodos axilares e inguinais em dez cães. Em três casos, os linfonodos inguinais encontravam-se a uma profundidade $\leq 0,56\text{ cm}$ e em sete casos estavam entre $\geq 0,6\text{ cm}$ e $\leq 0,9\text{ cm}$. Os linfonodos axilares variaram entre 1,1 cm até 2,2 cm de profundidade subcutânea.

A mastectomia unilateral total em bloco foi realizada em dezesseis cadelas. A amputação do membro torácico foi realizado em dois casos. No pós-operatório, seis cadelas apresentaram edema reversível no membro pélvico decorrente da mastectomia e linfadenectomia. No membro torácico uma cadela com mastocitoma cutâneo também apresentou edema reversível durante a primeira semana do pós-operatório. Nos trinta cães não foram observados efeitos adversos locais ou sistêmicos associados à administração intradérmica de indocianina verde. Os tutores não relataram alterações na cor da urina ou fezes, também não relataram sinais de alergia aos oito, quinze e 30 dias do pós-operatório.

Em relação ao protótipo de imagem NIR (Figura 6), os resultados descritos anteriormente demonstraram que o sistema desenvolvido apresenta potencial aplicação clínica para o mapeamento transcutâneo e percutâneo do linfonodo sentinela em cães.

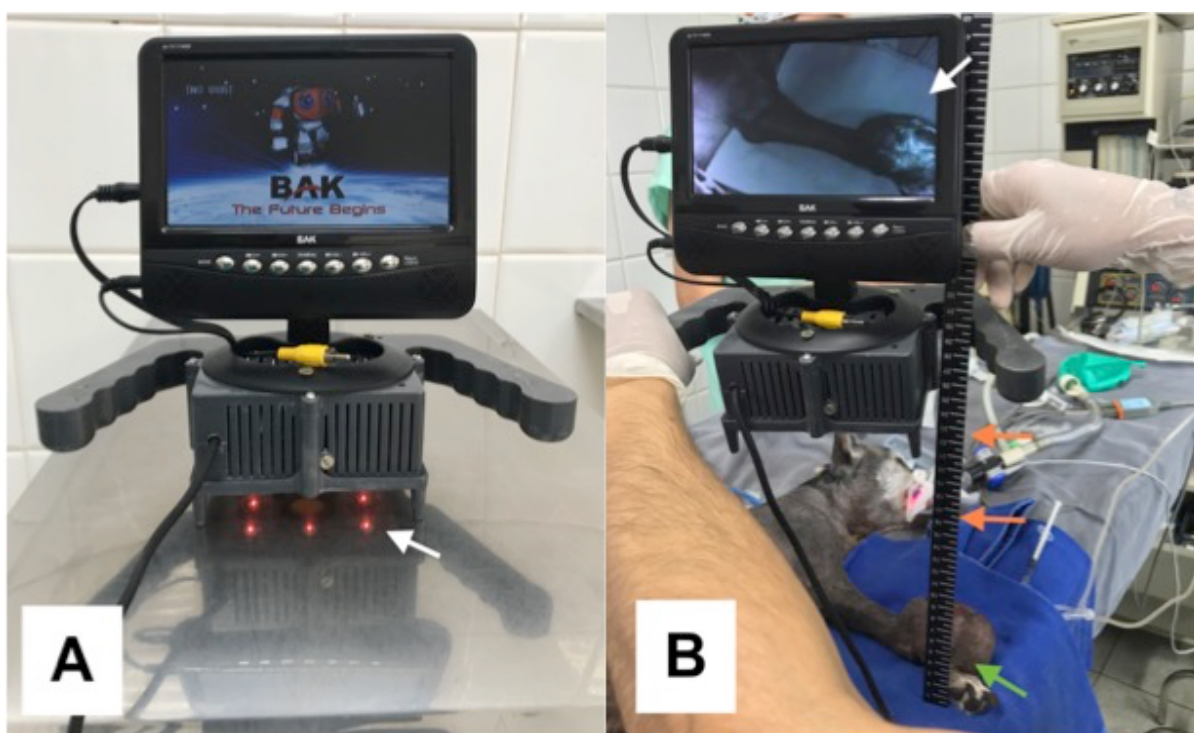


FIGURA 6. Fotografias do protótipo de imagem NIR. (A) A seta branca aponta a luz infravermelha procedente dos LEDs. (B) Avaliação transcutânea (seta branca), em tempo real, no período pré-cirúrgico da drenagem linfático de um neoplasma cutâneo em membro torácico. O protótipo é posicionado a uma distancia de 15 cm a 20 cm (seta laranja) sobre o neoplasma (seta verde)

4 | DISCUSSÃO

A imagem por fluorescência no infravermelho próximo (NIR) junto com a indocianina verde são uma técnica relativamente nova para o mapeamento do trajeto linfático e do linfonodo sentinela em cirurgia oncológica veterinária. Até o momento, apenas foi publicado o resumo de um estudo prospectivo de casos.⁵⁶ Nesse estudo, foi comparado a taxa de detecção do linfonodo sentinela entre imagem NIR, linfocintilografia e azul de metileno em oito cães com mastocitoma cutâneo.⁵⁶ Também existem outros dois estudos (proof-of-concept) realizados em cães sem neoplasmas referindo a praticabilidade da técnica de imagem NIR para a detecção transcutânea do linfonodo sentinela no linfocentro axilar, inguinal superficial, poplíteo⁴⁸ e mandibular.⁴⁷ O presente estudo, diferencia-se dos anteriores porque o mapeamento do linfonodo sentinela foi realizado em cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários e, além disso, o mapeamento transcutâneo e percutâneo do linfonodo sentinela foi por meio de um protótipo de imagem NIR, onde a fonte de luz de excitação são diodos emissores de luz (LEDs).

Os resultados da avaliação transcutânea demonstraram que em 25 cães (83,3%) foi possível rastrear o linfonodo sentinela observando a fluorescência do trajeto dos vasos linfáticos subcutâneos em direção de um linfocentro superficial específico, num intervalo de tempo de 2 a 18 min (média de 8,8min). Entretanto, através da avaliação percutânea guiada por NIR foram detectados os linfonodos sentinelas em 29 cães (96,6%). Sendo assim, no pré-operatório a técnica de imagem NIR sintetiza a localização do linfonodo sentinela e no intraoperatório fornece imagens, em tempo real, que facilitam o rápido reconhecimento visual do LS. Esses fatos, além da segurança farmacológica e ausência de coloração visual do leito cirúrgico, possivelmente constituem uma vantagem da imagem NIR em comparação com os corantes vitais³⁴ Porém, uma desvantagem após injeção peritumoral de ICV é a sua rápida disseminação pelos vasos linfáticos, corando além do linfonodo sentinela outros linfonodos não sentinelas na bacia linfática regional e consequente excessiva linfadenectomia e morbidade associada foi relatado na oncologia médica.²²

Pelo contrário, também deve ser considerado que o corante indocianina verde nem sempre flui no interior do linfonodo sentinela. Em estudo realizado em pessoas com câncer do colo do útero determinaram que o tamanho do tumor e o grau de invasão podem diminuir a taxa de detecção do LS com indocianina verde.⁵⁸ Esse fato ocorreu em duas cadelas que apresentavam carcinoma mamário papilífero grau III (T3 > 5 cm de diâmetro) e macrometástase no respectivo linfonodo axilar. Embora os vasos linfáticos apresentassem um padrão difuso ou linear de fluorescência transcutânea em direção axilar, não foi detectada marcação fluorescente dos linfonodos axilares. Em outro paciente com mastocitoma cutâneo de alto grau/grau II, o linfonodo metastático apenas apresentava leve fluorescência em uma pequena parte. Tais fatos sugerem que a obstrução mecânica por proliferação celular ou macrometástase dos linfonodos e consequente deformação da arquitetura interna impedem a circulação e captação da ICV no interior do linfonodo sentinela. Semelhante condição foi descrita em um caso utilizando azul patente V 2,5%,²⁸ e em outro estudo onde observaram que o fluxo e a captação do agente de contraste (iohexol) não foram visíveis por tomografia computadorizada.⁵⁷

Embora o conceito de linfonodo sentinela falso negativo não se aplica neste caso, as causas relatadas em humanos são obstrução do vaso linfático aferente por êmbolos tumorais, fibrose decorrente de cirurgia ou de radioterapia, ou severa inflamação local, nessas circunstâncias, o corante pode ser direcionado por um caminho alternativo para outro linfonodo livre de metástase.^{59,60} Existe também a possibilidade da ocorrência de duas vias linfáticas para uma mesma área neoplásica, ou raramente, os vasos linfáticos se conectarem com um linfonodo superior sem entrar em contato com o linfonodo implicado.^{13,60} Em relação ao padrão de drenagem linfático difuso ou desorganizado observado, estudos realizados em humanos sugerem que ocorre em presença de fluxo linfático danificado como no linfedema, ou quando existe um excessivo crescimento de capilares linfáticos.^{61,62} Na ausência de um drenagem linfático direcional deve ser considerada a possibilidade de colapso dos capilares linfáticos ou elevada pressão linfática.⁶²

Em regiões corporais onde os vasos linfáticos subcutâneos ou os linfonodos sentinelas estavam cobertos por uma espessa camada de tecido subcutâneo ou gordura (≥ 10 mm) detectamos uma débil sinal fluorescente transcutânea por meio da câmera do protótipo NIR, que pode passar despercebido em cães de pele branca e em salas iluminadas. Esse fato foi corroborado em pacientes com neoplasmas mamários que tinham trajetos linfáticos entrecortados e/ou com sinal de fluorescência leve em relação à intensidade da fluorescência no local de injeção da ICV. Nesses pacientes, após a mastectomia unilateral total, observamos que do lado oposto da peça cirúrgica (cadeia mamária), os vasos linfáticos e os linfonodos inguinais superficiais entremeados no tecido adiposo emitiam sinais de fluorescência intenso. Em outro estudo também relataram que o trajeto linfático desde a glândula mamária abdominal caudal e o linfonodo inguinal superficial não foram detectados por meio do sistema de imagem NIR; porém, por intermédio da ultrassonografia com contraste detectaram um linfonodo inguinal superficial localizado a 1,2 cm de profundidade.²⁶ Assim sendo, quanto mais profundo está localizado o fluoróforo fluorescente NIR exógeno, menos luz de excitação estará disponível para gerar um sinal fluorescente.^{29,63} Possivelmente a chave para obter uma imagem NIR eficaz em regiões anatómicas mais profundas que 1 cm é a fonte de luz dependente do sistema de imagem NIR utilizado.^{32,40,63} Foi relatado que a luz fluorescente pode ser detectada mesmo através de tecidos moles espessos de aproximadamente 1cm até 3 cm.^{30,31,63} Alguns estudos sugerem que associar albumina sérica humana com ICV aprimora a eficiência de fluorescência,⁶³ porém num estudo comparativo não se observaram vantagens dessa associação no mapeamento do linfonodo sentinela no câncer de mama.⁶⁴ Também, é importante considerar que outras variáveis como a iluminação da sala cirúrgica, a luz ambiente, a distância entre a câmera NIR com os tecidos avaliados e a absorção da ICV no sítio da injeção podem contribuir na dispersão da luz.^{28,48}

Em estudo realizado em seis cães sem neoplasmas foi reportada a viabilidade da imagem NIR para a detecção transcutânea do linfonodo mandibular ipsilateral e do trajeto linfático subcutâneo associado num intervalo de tempo de 4 a 15 min, após injeção de 1 mL de ICV (concentração de 0,5mg/mL) na mucosa oral.⁴⁷ Possivelmente, a metodologia empregada nesse estudo é uma alternativa para a detecção transcutânea do linfocentro parotídeo ou retrofaringeo em cães com neoplasmas em cabeça. Porém, considerando a localização anatômica

relativamente mais profunda do linfocentro retrofaríngeo (linfonodo retrofaríngeo medial e/ou linfonodo retrofaríngeo lateral),¹⁶ em comparação aos linfocentros mandibular ou parotídeo, foi observado que o mapeamento percutâneo NIR através de uma pequena incisão cutânea ventral é uma alternativa praticável, ou como uma guia visual intraoperatória acompanhando às técnicas cirúrgicas disponíveis para a remoção seletiva dos linfonodos regionais em pescoço.^{66,67} Em outro estudo relataram que além da linfocintilografia regional precisaram da linfocintilografia intraoperatória para detectar um linfonodo retrofaríngeo lateral metastático.¹¹ Também a linfografia indireta radiográfica é outra alternativa pré-cirúrgica útil para mapeamento do linfonodo retrofaríngeo medial, seguida de azul de metileno no intraoperatório para facilitar a sua detecção.¹²

No que tange à detecção transcutânea do linfonodo axilar próprio e do linfonodo axilar acessório, um estudo relatou que foi necessário aplicar uma leve pressão na pele e alterar a posição dos cães em relação à câmera NIR para detectar um sinal fluorescente fraco transcutâneo aos 30 min da avaliação, sob uma alta exposição no equipamento de imagem NIR.⁴⁸ Diferente desse estudo, conseguimos detectá-los após uma incisão cutânea na região axilar, afastando delicadamente as bordas da pele e tecido subcutâneo, semelhante como foi relatado em pessoas.^{39,40} Embora o mapeamento percutâneo guiado por imagem NIR foi útil para detectar rapidamente o linfonodo sentinela no linfocentro axilar, no linfocentro retrofaríngeo e no linfocentro cervical superficial, não foi favorável em um cão que apresentava mastocitoma cutâneo na região do ísquio. Nesse caso, o neoplasma provavelmente drenou para o linfocentro iliosacral.^{16,65} Possivelmente, a associação de NIR com outras técnicas de mapeamento favoreça a detecção mais precisa do linfonodo sentinela em regiões profundas ou intracavitárias.^{22,56}

Da mesma maneira como foi demonstrado em outros estudos realizados em cães com neoplasmas cutâneos malignos,^{11,12} e em neoplasmas mamários,⁶⁸ neste estudo observamos que em nove (30%) cães o linfonodo sentinela não foi o linfonodo regional mais próximo do neoplasma, e além disso, em cinco casos os neoplasmas drenaram simultaneamente para dois linfocentros diferentes. O padrão clássico de drenagem linfática das glândulas mamárias sem alterações neoplásicas foram relatados em vários estudos.^{27,69-71} Normalmente a glândula mamária M3 drena simultaneamente para o linfonodo axilar ipsilateral e inguinais superficiais ipsilaterais ou apenas para o linfonodo axilar.^{27,69-71} Enquanto a glândula mamária M4 drena para o linfonodo inguinal superficial ipsilateral ou simultaneamente para o linfonodo inguinal e linfonodo ilíaco medial.^{27,69-71} No entanto, na presença de neoplasmas em M3 ou em M4 podem ocorrer padrões atípicos como observado neste estudo, onde um neoplasma localizado em M3 drenou apenas para o linfonodo inguinal superficial e, em dois casos o neoplasma em M4 drenou para o linfonodo axilar e inguinal superficial ipsilateral. Anastomoses linfáticas e a ocorrência de metástase em linfocentros contralaterais podem acontecer e devem ser consideradas em cães com neoplasmas mamários.^{28,71}

Em cães com mastocitoma cutâneo localizado na base da orelha, o padrão de drenagem linfática pode variar como aconteceu em dois pacientes. Um deles drenou para o linfonodo cervical superficial ipsilateral similar ao relatado em três estudos.^{11,12,58} Mas, no segundo caso o linfonodo sentinela foi o linfonodo retrofaríngeo medial. Os neoplasmas nessa localização também podem drenar simultaneamente para o linfonodo parotídeo e para o linfonodo cervical superficial ou

apenas para o linfonodo retrofaríngeo lateral,¹¹ o que raramente ocorre.^{15,16} No que tange à drenagem linfática dos membros torácicos, independentemente da localização, todos os neoplasmas drenaram para o linfonodo cervical superficial ipsilateral. Foi descrito que a pele e o tecido subcutâneo da face lateral e da face crânio-medial do membro torácico drenam para o linfocentro cervical superficial ventral, mas que o restante da superfície caudo-medial do membro drena apenas para o linfocentro axilar.^{65,72} O limite lateral entre o linfocentro cervical superficial e o linfocentro axilar é a borda caudal do músculo extensor ulnar do carpo,⁷² mas o limite medial nessa região do carpo não foi bem definida^{65,72} e possivelmente, esse fato justifica porque o carcinoma de células escamosas localizado na região palmar do carpo drenou simultaneamente para o linfonodo cervical superficial e para o linfonodo axilar.

Nos membros pélvicos de três neoplasmas que estavam próximos do linfonodo poplíteo, apenas o tumor localizado em região do tarso drenou para o linfonodo poplíteo, coincidindo com outros estudos.^{48,65,73} Foi demonstrado que o linfonodo ilíaco medial em 100% dos casos recebe diretamente a drenagem linfática eferente do linfonodo poplíteo.⁷³ Embora em 26% dos casos podem drenar diretamente no linfonodo ilíaco interno e/ou para o linfonodo sacral. No entanto, é importante considerar que 4% dos casos drenaram primeiramente no linfonodo femoral para depois prosseguir para o linfonodo ilíaco interno.⁷³ Mediante a imagem NIR não foi possível detectar a drenagem linfática eferente em nenhum dos casos localizados em membros pélvicos e na região inguinal.

As limitações do estudo foram o pequeno número de cães com tumores cutâneos e ausência de casos com neoplasmas orais. Além disso, não foram utilizados outros métodos para marcação do LS e subsequente estudo comparativo com o protótipo de imagem NIR para demonstrar a eficácia da técnica na detecção do linfonodo sentinela. O risco de linfonodos falsos negativos durante a avaliação histopatológica e não emprego da imunohistoquímica para confirmar a ausência de metástases nos linfonodos sentinelas e regionais. Em relação ao protótipo de imagem NIR uma limitante foi a ergonomia e ausência de um software de imagem que facilite melhorar a sensibilidade da imagem segundo a região anatômica e profundidade avaliada.

Em conclusão, com base na metodologia usada no presente trabalho, pode-se sugerir que a curva de aprendizagem para realizar o mapeamento e detecção do linfonodo sentinela durante o pré-cirúrgico e no intraoperatório por meio da imagem NIR é simples, rápida e segura. Uma desvantagem do protótipo NIR é a sua capacidade reduzida para detectar os linfonodos sentinelas em regiões anatômicas relativamente profundas ou em presença de uma camada espessa de tecido adiposo subcutâneo (≥ 10 mm).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, et al. European consensus document on mast cell tumor in dogs and cats. *Vet Comp Oncol*. 2012;10:e1-e29.
2. Warland J, Amores-Fuster I, Newbury W, Brearley M, Dobson J. The utility of staging in canine mast cell tumours. *Vet Comp Oncol*. 2014;12(4):287-298.
3. Pizzoni S, Sabattini S, Stefanello D, et al. Features and prognostic impact of distant metastases in 45 dogs with de novo stage IV cutaneous mast cell tumours: a prospective study. *Vet Comp Oncol*. 2017;16(1):28-36.
4. Sorenmo KU, Rasotto R, Zappulli V, Goldschmidt MH. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Vet Pathol*. 2011;48(1):85-97.
5. Szczubial M, Lopuszynski W. Prognostic value of regional lymph node status in canine mammary carcinomas. *Vet Comp Oncol*. 2011;9(4):296-303.
6. de Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, Cassali GD. Quantification of the regional lymph node metastatic burden and prognosis in malignant mammary tumors of dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;29(5):1360-1367.
7. Bergman PJ, Selmic LE, Kent MS. Melanoma. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM, eds. *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 6th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2020:367-381.
8. Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 2003;222(9):1234-1236.
9. Skinner OT, Boston SE, Souza CHM. Patterns of lymph node metastasis identified following bilateral mandibular and medial retropharyngeal lymphadenectomy in 31 dogs with malignancies of the head. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(3):881-889.
10. Ferrari R, Marconato L, Buracco P, Boracchi P, Giudice C, Iussich S, Grieco V, Chiti LE, Favretto E, Stefanello D. The impact of extirpation of non-palpable/normal-sized regional lymph nodes on staging of canine cutaneous mast cell tumours: A multicentric retrospective study. *Vet Comp Oncol*. 2018;16(4):505-510.
11. Worley DR. Incorporation of sentinel lymph node mapping in dogs with mast cell tumours: 20 consecutive procedures. *Vet Comp Oncol*. 2014;12(3):215-226.
12. Brissot HN, Edery EG. Use of indirect lymphography to identify sentinela lymph node in dogs: a pilot study in 30 tumours. *Vet Comp Oncol*. 2017;15(3):740-753.
13. Miura H, Ono, S, Shibutani K, Seino H, et al. Contribution of dynamic sentinel lymphoscintigraphy images to the diagnosis of patients with malignant skin neoplasms in the upper and lower extremities. *SpringerPlus*. 2014; 3 (625):1-12.
14. Patsikas MN, Karayannopoulou M, Kaldrymidov E, Papazoglou LG, Papadopoulou PL, Tzegas SI, et al. The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. *Anat Histol Embryol*. 2006; 35(4):228-234.
15. Belz GT, Heath TJ. Lymph pathways of the medial retropharyngeal lymph node in dogs. *Journal of Anatomy*. 1995;186(Pt 3):517-526.

16. Bezuidenhout AB. The lymphatic system. In: Evans HE, de Lahunta A, eds. *Miller's Anatomy of the Dog*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2013:535-562.
17. Qian CN, Berghuis B, Tsarfaty G, Brunch M, Kort EJ, Ditlev J, Tsarfaty I, Hudson E, Jackson DG, Ptillo D, Chen J, Resau JH, Teh BT. Preparing the "soil": the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinela lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res*. 2006;66(21):10365-10376.
18. Dieterich LC, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and new drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;99(PtB):148-160.
19. Morton DL, Wen JH, Wong JS, Economou LA, Cagle FK, Storm et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992;127(4):392-399.
20. Krag D, Weaver D, Ashikaga T, et al. The sentinel node in breast cancer –a multicenter validation study. *N Engl J Med*. 1998;339(14):941-946.
21. Bagaria SP, Faries MB, Morton DL. Sentinel node biopsy in melanoma: technical considerations of procedure as performed at the John Wayne Cancer Institute. *J Surg Oncol*. 2010;101(8): 669-676.
22. Niebling MG, Pleijhuis RG, Bastiaannet E, Brouwers AH, van Dam GM, Hoekstra HJ. A systematic review and meta-analyses of sentinel lymph node identification in breast cancer and melanoma, a plea for tracer mapping. *Eur J Surg Oncol* 2016;42(4):466-473.
23. Tuohy JL, Milgram J, Worley DR, Dernell WS. A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. *Vet Comp Oncol*. 2009; 7(2):81-91.
24. Beer P, Pozzi A, Rohrer Bley C, Bacon N, Pfammatter NS, Venzin C. The role of sentinel lymph node mapping in small animal veterinary medicine: A comparison with current approaches in human medicine. *Vet Comp Oncol*. 2017;16(2):178-187.
25. Balogh L, Thuróczy J, Andócs G, et al. Sentinel lymph node detection in canine oncological patients. *Nucl Med Rev*. 2002;5(2):139-144.
26. Pinheiro LGP, Moraes MO, Soares AH, Lopes AJT, Nagueire MASP, Gondim FAL, Brandão CB, Nascimento DCH, Soares JPH, Silva JMM. Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e Tecnécio TC99m. *Acta cirúrgica Brasileira* 2003;18:514-517.
27. Pereira C.T.; Marques, F.L.; WILLIAMS, J.; De Martin B.; Bombonato, P.D. ^{99m}Tc-Labeled dextran for mammary lymphoscintigraphy in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2008; 49(5):487-491.
28. Beserra HEO, Grandi F, Dufloth RM, et al. Metastasis of mammary carcinoma in bitches: evaluation of the sentinel lymph node technique. *Adv Breast Cancer Res*. 2016;5(02):58-65.
29. Choy G, Choyke P, Libutti SK. Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. *Mol Imagin*. 2003; 2(4):303-312.
30. Troyan SL, Kianzad V, Gibbs-Strauss SL, et al. The FLARE™ intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinela lymph node mapping. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(10):2943-2952.

31. Hirche C, Engel H, Kolios L, Cognie JVS, Hünnerbein M, Lehnhardt M, Kremer T. An experimental study to evaluate the Fluobeam 800 imaging system for fluorescence-guided lymphatic imaging and sentinel node biopsy. *Surg Innov.* 2012;20(5):516-523.
32. Hilderbrand SA, Weissler R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol.* 2010;14(1):71-79.
33. Polom K, Murawa D, Rho YS, Nowaczyk P, et al. Current trends and emerging future of indocyanine green usage in surgery and oncology: a literature review. *Cancer.* 2011;117(21):4812-4822.
34. Schaafsma BE, Mieog JSD, Hutteman M, van der Vorst JR, et al. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol.* 2011 104(3):323-332.
35. Madajewski B, Judy BF, Mouchli A, Kapoor V, et al. Intraoperative Near-Infrared Imaging of Surgical Wounds after Tumor Resections Can Detect Residual Disease. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5741-5751.
36. Gioux S, Choi HS, Frangioni JV. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging.* 2010;9(5):237-255.
37. DSouza AV, Lin H, Henderson ER, Samkoe KS, Pogue BW. Review of fluorescence guided surgery systems: identification of key performance capabilities beyond indocyanine green imaging. *J Biomed Opt.* 2016; 21(8):080901.
38. Munabi NCO, Olorunnipa OB, Goltsman D, Rohde CH, Ascherman JA. The ability of intra-operative perfusion mapping with laser-assisted indocyanine green angiography to predict mastectomy flap necrosis in breast reconstruction: a prospective trial. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2014, 67(4):449-455.
39. Kitai T, Inomoto T, Miwa M, Shikayama T. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer.* 2005;12(3):211-215.
40. Fujiwara M, Mizukami T, Suzuki A, Fukamizu H. Sentinel lymph node detection in skin cancer patients using real-time fluorescence navigation with indocyanine green: preliminar experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009;62(10):e373-378.
41. Hackethal A, Hirschburger M, Eicker SO, Mücke T, Lindner C, Buchweitz O. Role of indocyanine green in fluorescence imaging with Near –Infrared Light to identify sentinela lymph nodes, Imphatic vessels and pathways prior to surgery – A critical evaluation of options. *Geburtshilfe Frauenheilk.* 2018;78(1):54-62.
42. van Manen L, Handgraaf HJM, Diana M, Dijkstra J, Ishizawa T, Vahrmeijer AL, Mieog JSD. A practical guide for the use of indocyanine green and methylene blue in fluorescence-guided abdominal surgery. *J Surg Oncol.* 2018;118(2):283-300.
43. Wolf S, Arend O, Schulte K, Reim M. Severe anaphylactic reaction after indocyanine green fluorescence angiography. *Am J Ophthalmol.* 1992;114(5):638-639.
44. Iida G, Asano K, Seki M, Ishigaki K, et al. Intraoperative identification of canine hepatocellular carcinoma with indocyanine green fluorescence imaging. *J Small Anim Pract.* 2013,54(11):594-600.

45. Reynolds JS, Troy TL, Mayer RH, Thompson AB, et al. Imaging of spontaneous canine mammary tumors using fluorescent contrast agents. *Photochemistry and Photobiology* 1999, 70(1):87-94.
46. Gurfinkel M, Thompson AB, Ralston W, Troy TL, et al. Pharmacokinetics of ICG and HPPH-car for the detection of normal and tumor tissue using fluorescence, near-infrared reflectance imaging: a case study. *Photochem Photobiol.* 2000, 72(1):94-102.
47. Townsend KL, Milovancev M, Bracha S. Feasibility of near-infrared fluorescence imaging for sentinel lymph node evaluation of the oral cavity in healthy dogs. *Am J Vet Res.* 2018, 79(9):995-1000.
48. Favril S, Stock E, Hernot S, Hesta M, et al. Sentinel lymph node mapping by near-infrared fluorescence imaging and contrast – enhanced ultrasound in healthy dogs. *Vet Comp Oncol.* 2019;17(1):88-98.
49. Stromberg PC, Meuten DJ. Trimming tumors for diagnosis and prognosis. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017:27-43.
50. Cassali GD, Lavallo GE, Ferreira E, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment for canine mammary tumors-2013. *BJVP.* 2014;7(2):38-69.
51. Mattie J. Hendrick. Mesenchymal tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc., 2017:142-175.
52. Goldschmidt M, Goldschmidt KH. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. 5th ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. 2017:88-141.
53. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol.* 2010;48(1):147-155.
54. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol.* 1984;21(5):469-474.
55. Weishaar KM, Thamm DH, Worley DR, et al. Correlation of nodal mast cell with clinical outcome in dogs with mast cell tumour and a proposed classification system for the evaluation metastasis. *J Comp Pathol.* 2014;151(4):329-338.
56. Beer P, Venzin C, Rohrer BC, Giovanoli P, Smolders LA, Pozzi A. A comparison of near-infrared fluorescence imaging, lymphoscintigraphy and methylene blue dye method for intraoperative sentinel lymph node mapping in canine cell tumors: A prospective case series. Scientific presentation abstracts: 2019 European College Veterinary Surgeons 28th Annual Scientific Meeting, July 2-4, 2019-Budapest, Hungary. *Veterinary Surgery.* 2019;48(5):631-684.
57. Rossi F, Körner M, Suárez J, Carozzi G, et al. Computed tomographic-lymphography as a complementary technique for lymph node staging in dogs with malignant tumors of various sites. *Vet Radiol Ultrasound.* 2018; 59(2):155-162.

58. Kim JH, Kim DY, Suh DS, Kim JH, et al. The efficacy of sentinel lymph node mapping with indocyanine green in cervical cancer. *World J Surg Oncol*. 2018;16(1):52.
59. Karaman S, Detmar M. Mechanisms of lymphatic metastasis. *J Clin Invest*. 2014;v.124(3):922-928.
60. Kataria K, Srivastava A, Qaiser D. What is a false negative sentinel node biopsy: definition, reasons and ways to minimize it?. *Indian J Surg*. 2016;78(5):396-401.
61. Mihara M, Hara H, Araki J, Kikuchi K, Narushima M, et al. Indocyanine green (ICG) lymphography is superior to lymphoscintigraphy for diagnostic imaging of early lymphedema of the upper limbs. *PLoS ONE*. 2012; 7(6):e38182.
62. Gray RJ, Voegeli D, Bader DL. Features of lymphatic dysfunction in compressed skin tissues - Implications in pressure ulcer aetiology. *J Tissue Viability*. 2016; 25(1):26-31.
63. Tanaka E, Choi HS, Fujii H, Bawendi MG, Frangioni JV. Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed preclinical development for sentinel lymph node mapping. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13(12):1671-1681.
64. Hutteman M, Mieog JSD, van der Vorst JR, et al. Randomized, double-blind comparison of indocyanine green with or without albumin premixing for near-infrared fluorescence imaging of sentinel lymph nodes in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;127(1):163-170.
65. 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(7):e69222.
66. Green K, Boston SE. Bilateral removal of the mandibular and medial retropharyngeal lymph nodes through a single ventral midline incision for staging of head and neck caers in dogs: a description of surgical technique. *Vet Comp Oncol*, 2017;15(1):208-214.
67. Wainberg SH, Oblak ML, Giuffrida MA. Ventral cervical versus bilateral lateral approach for extirpation of mandibular and medial retropharyngeal lymph nodes in dogs. *Vet Surg*. 2018;47(5), 629-633.
68. Soultani C, Paisikas M. Assessment of sentinel lymph node metastasis in canine mammary gland tumors using computed tomographic indirect lymphography. *Vet Radiol Ultrasound*. 2017;58(2):186-196.
69. Patsikas MN and Dessiris A. The lymph drainage of mammary glands. In the bitch: a lymphographic study. Part I: the 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. *Anat Histol Embryol*. 1996;25(2):131-138.
70. Patsikas M N, Dessiris A. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part II: the 3rd mammary gland. *Anat Histol Embryol*, 1996; 25(2):139 – 143.
71. Pereira CT, Rahal SC, de Carvalho Balieiro JC, Ribeiro AA. Lymphatic drainage on healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat Histol Embryol*. 2003;32(5):282-290.
72. Suami H, Shin D and Chang DW. Mapping of lymphosomes in the canine forelimb: comparative anatomy between canines and humans. *Plast Reconstr Surg*. 2012; 129(3): 612-620.

73. Mayer NM, Sweet KA, Patsikas MN, Sukut SL, Waldner CL. Frequency of an accessory popliteal efferent lymphatic pathway in dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2018;59(3):365

APÊNDICE

Apêndice 1 Localização anatômica dos linfonodos sentinelas em 30 cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários

#Cão Raça	Localização Neoplasmas	Neoplasma Diagnóstico	Linfocentro	Tamanho			Trajeto Linfático	Fluorescência LS		LS localização	LS metástase
				NP	N	A		TRANS	PERCU		
1 SRD	Rádio distal, medial direito	STS grau I	cervical axilar	-- 1	1 --	-- --	3min --	sim --	sim --	cervical --	Negativo --
2 SRD	Radio proximal, lateral esquerdo	Mastocitoma baixo/grau II	cervical axilar	-- 1	-- --	1 --	7min --	sim --	sim --	cervical --	Positivo --
3 GoldR	Cotovelo, lateral direito	Mastocitoma baixo/grau I	cervical axilar	-- 1	1 --	-- --	11 min --	não --	sim --	cervical --	Negativo --
4 SRD	Carpó, palmar direito	CEC	cervical axilar	-- --	-- --	1 1	8 min 8 min	sim --	sim sim	cervical axilar	Negativo Negativo
5 Beagle	Ombro , lateral esquerdo	STS grau II	cervical axilar	-- 1	1 --	-- --	6min --	sim --	Y --	cervical --	Negativo --
6 Yorki	Metacarpo, dorsal direito	STS grau II	cervical axilar	-- 1	-- --	1 --	11min --	sim --	sim --	cervical --	Negativo --
7 SRD	Tíbia distal, medial direito	HSA cutâneo	inguinal poplíteo	-- --	1 1	-- --	7min --	não --	sim --	inguinal --	Positivo --
8 GoldR	Tarso, plantar direito	Mastocitoma baixo/grau II	inguinal poplíteo	-- --	1 --	-- 1	-- 9min	-- sim	-- sim	-- poplíteo	-- Positivo
9 PitBull	Fêmur proximal, medial direito	Mastocitoma alto/grau II	inguinal poplíteo	-- --	-- 1	1 --	-- --	não --	sim --	inguinal --	Positivo --
10 Poodle	Fêmur proximal, lateral direito	STS grau I	inguinal poplíteo	-- --	1 1	-- --	13min --	sim --	sim --	inguinal --	Negativo --

Legendas: SRD: sem raça definida; Yorki: York Shire; GoldR: Golden Retriever; STS: sarcoma de partes moles; HSA: hemangiossarcoma cutâneo; CEC: carcinoma de células escamosas; N: normal; NP: não palpável; A: anormal; LS: linfonodo sentinela; TRANS: transcutâneo.

Apêndice 1 Localização anatômica dos linfonodos sentinelas em 30 cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários (continuação)

#Cão Raça	Localização Neoplasmas	Neoplasma Diagnóstico	Linfocentro	Tamanho			Trajeto Linfático	Fluorescência LS		LS localização	LS metástase
				NP	N	A		TRANS	PERCU		
11 Boxer	Ísqio direito	Mastocitoma alto/grau II	inguinal	--	1	--	--	não	não	--	--
12 PitBull	Abdômen caudal	HSA cutâneo	poplíteo	--	1	--	--	não	não	--	--
			inguinal axilar	--	--	1	9 min	não	sim	inguinal	Negativo
13 SRD	Abdômen caudal	CEC e HSA cutâneo	axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			inguinal axilar	--	--	1	13 min 9 min	não	sim	inguinal axilar	Negativo Negativo
14 Pug	Base orelha direita (recidiva)	Mastocitoma alto/grau II	parotídeo	--	1	--	--	não	--	--	--
			retrofaringeo	1	--	--	--	não	sim	retrofaringe	Positivo
15 Boxer	Base orelha direita (recidiva)	Mastocitoma alto/grau II	parotídeo	1	--	--	--	não	não	--	--
			cervical	--	1	--	2 min	não	sim	cervical	Positivo
16 Yorki	M3 direita	Carcinoma em tumor misto grau II	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	1	1	--	18 min	não	sim	inguinal	negativo
17 SRD	M5 esquerda	Carcinoma em tumor misto grau I	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	--	1	--	--	não	sim	inguinal	negativo
18 Teckel	M4 esquerda	Carcinoma papilar grau I	Axilar	1	--	--	17 min	não	sim	axilar	positivo
			Inguinal	--	--	1	--	não	sim	inguinal	positivo
19 SRD	M5 direita	Carcinossarcoma grau III	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	1	--	1	4 min	sim	sim	inguinal	negativo
20 SRD	M5 esquerda	Carcinoma misto grau I	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			inguinal	1	1	--	2 min	sim	sim	inguinal	negativo

Legendas: SRD: sem raça definida; Yorki: York Shire; GoldR: Golden Retriever; STS: sarcoma de partes moles; HSA: hemangiossarcoma cutâneo; CEC: carcinoma de células escamosas; N: normal; NP: não palpável; A: anormal; LS: linfonodo sentinela; TRANS: transcutâneo.

Apêndice 1 Localização anatômica dos linfonodos sentinelas em 30 cães com neoplasmas malignos cutâneos ou mamários (continuação)

#Cão Raça	Localização Neoplasmas	Neoplasma Diagnóstico	Linfocentro	Tamanho			Trajeto Linfático	Fluorescência LS		LS localização	LS metástase
				NP	N	A		TRANS	PERCU		
21 SRD	M4 direita	Carcinoma misto grau I	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	1	1	--	4 min	sim	sim	inguinal	negativo
22 SRD	M4 esquerda	Carcinoma papilífero grau III	Axilar	1	--	--	8min	não	não	axilar	positivo
			Inguinal	--	--	1	--	não	sim	inguinal	positivo
23 SRD	M5 direita	Carcinoma misto grau II	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	2	1	--	3 min	sim	sim	inguinal	negativo
24 PitBull	M4 direita	Carcinoma tubular grau I e CEC	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	--	--	1	13 min	sim	sim	inguinal	negativo
25 PitBull	M4 esquerda	Carcinoma cribiforme	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	--	--	1	9 min	sim	sim	inguinal	positivo
26 SRD	M2 direita	Carcinoma tubular grau I	Axilar	1	--	--	3 min	não	sim	axilar	negativo
			Inguinal	1	1	--	--	--	--	--	--
27 SRD	M4 direita	Carcinoma cribiforme	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	--	--	1	5 min	sim	sim	inguinal	positivo
28 SRD	M4 direita	Carcinoma misto grau II	Axilar	1	--	--	--	--	--	--	--
			Inguinal	--	--	1	2 min	sim	sim	inguinal	negativo
29 SRD	M2 direita	Carcinoma misto grau I	Axilar	1	--	--	2 min	não	sim	axilar	negativo
			Inguinal	1	1	--	--	--	--	--	--
30 SRD	M3 direita	Carcinoma papilar grau III	Axilar	2	--	--	2 min	não/sim	não/sim	axilar	positivos
			Inguinal	--	--	1	--	sim	sim	inguinal	positivo

Legendas: SRD: sem raça definida; Yorki: York Shire; GoldR: Golden Retriever; STS: sarcoma de partes moles; HSA: hemangiossarcoma cutâneo; CEC: carcinoma de células escamosas; N: normal; NP: não palpável; A: anormal; LS: linfonodo sentinela; TRANS: transcutâneo.