



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

REBECA CORDEIRO JUSTINO

**O MAPEAMENTO LINFÁTICO DE CORNOS E CORPO
UTERINO EM CADELAS UTILIZANDO O CORANTE AZUL
PATENTE V**

REBECA CORDEIRO JUSTINO

**O MAPEAMENTO LINFÁTICO DE CORNOS E CORPO
UTERINO EM CADELAS UTILIZANDO O CORANTE AZUL
PATENTE V**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação para a obtenção do título de Mestre, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Profa Dra Maria Isabel Mello Martins.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

J96m Justino, Rebeca Cordeiro.

O mapeamento linfático de cornos e corpo uterino em cadelas utilizando o corante azul patente V / Rebeca Cordeiro Justino. – Londrina, 2014.
65 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Cão – Reprodução – Teses. 2. Útero – Teses. 3. Linfonodos – Teses. 4. Anafilaxia – Teses. 5. Reprodução animal – Teses. I. Martins, Maria Isabel Mello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

REBECA CORDEIRO JUSTINO

**O MAPEAMENTO LINFÁTICO DE CORNOS E CORPO UTERINO EM
CADELAS UTILIZANDO O CORANTE AZUL PATENTE V**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação para a obtenção do título de Mestre, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Mello
Martins
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Londrina, 20 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho a meu maravilhoso e amado Deus e ao meu marido Fred, ambos companheiros inseparáveis e fonte de força e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, sempre fiel, misericordioso, justo e presente. Cada conquista, cada realização, cada degrau que subo na escada da vida devo a Ele, que me traz consolo e auxílio nas horas de dificuldades, direção nos momentos de dúvida e paz, muita paz, para seguir em frente.

Agradeço a minha orientadora não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua amizade, paciência e dedicação. Tivemos momentos bons e ruins juntas, mas com resultados sempre positivos. Muito obrigada pelo voto de confiança, por sempre acreditar mais em mim do que eu mesma e por sempre andar mais uma milha ao meu lado.

Ao meu marido Fred, presente de Deus, maravilhoso, companheiro e incrivelmente paciente. Sempre que precisei de um ombro pra chorar e de palavras sábias pra me colocar de volta em meu eixo ele estava presente. Sua colaboração e compreensão foram inestimáveis para a realização deste mestrado.

Aos meus pais amados, Rodinei e Léia, pelo suporte financeiro, emocional e educacional. Ensinarão-me a ser quem sou hoje, muito mais com atitudes do que com palavras, mostrando o real valor das pessoas e das conquistas. Sempre me incentivando: “estudo em primeiro lugar”. Em especial ao meu pai que me ensinou que não há vergonha em tentar de novo e que é preciso coragem para voltar atrás. Perseverança sempre foi sua marca.

À toda minha família, meus tios, meus avós, todos que de alguma maneira participaram do meu crescimento e formação do meu caráter. Em especial às minhas pequenas caçulinhas, que amo demais, Anna carolina e Anna Beatriz.

Ao professor Guilherme, pelas idéias, risadas, pela parceria nos experimentos e principalmente pela paciência. Profissional exemplar, apaixonado pelo que faz, acrescentou muito a este projeto.

Às professoras Angelita e Carmen Hilst, presentes em minha vida desde a graduação. Com orientações, conselhos e até broncas, sempre cuidaram de mim. São exemplos de grandes profissionais, cuidadosas e dedicadas.

Aos companheiros de projeto Rafael, Luiz Guilherme, Deise, Gabriel

e a todos que, de alguma maneira, contrubuíram para realização dos experimentos. Muito obrigada por toda ajuda, pela paciência comigo e meu terrível temperamento, pelo tempo investido no meu sonho.

Aos funcionários Verônica, Paulão, Cláudia, Helenice, Vilma, Nélio, Neusa, Moacir e Rose pelo auxílio, paciência, disponibilidade e participação fundamental para realização desse e de outros projetos.

Aos funcionários Tião, Maristela, Álvaro e Eleni pelas conversas no corredor, as risadas, os cafezinhos. Fizeram meus dias melhores e com certeza mais divertidos.

À professora Ana Paula pelas orientações e pela disponibilização do Laboratório de Patologia para realização de parte do experimento desta dissertação.

Ao professor Marcelo Seneda pelo acolhimento e pelas conversas edificadoras. Exemplo de profissional e de ser humano. Sempre compreensivo, atencioso e brincalhão. Lembro-me de uma aula na graduação onde desenhou no quadro os pilares da vida e falou sobre o equilíbrio das nossas prioridades. Educador no sentido literal da palavra.

Às amigas Alessandra Taroda, Kátia Cristina e Luciana Marinho pelos almoços, conversas e risadas. Minhas conselheiras acadêmicas e companheiras pra todas as horas. Graças a esse retorno ao mestrado nos aproximamos e hoje sou mais feliz por tê-las por perto.

Às amigas Débora Cristina e Jaqueline Moretão, pela amizade incondicional, entenderam a falta de tempo e torceram por mim. Companheiras pra todas as horas, oraram por essa conquista e me abençoaram muito com ótimas conversas.

Aos professores Selwyn Arlington Headley e Mônica Vicky Bahr Arias pela participação na banca de qualificação, pelo tempo investido para corrigir e pela grande contribuição dada ao trabalho.

Ao programa de pós graduação em ciência animal, representado pelo coordenador professor Amaury Alcindo Alfieri, pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela bolsa de mestrado, sem o qual esta empreitada não seria realizada.

“Do fruto de sua boca o homem se beneficia, e o trabalho de suas mãos será recompensado”

Provérbios 12:14

JUSTINO, Rebeca Cordeiro. **O mapeamento linfático de cornos e corpo uterino em cadelas utilizando o corante azul patente V.** 2014. 65 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O primeiro linfonodo a receber a drenagem de uma região específica do corpo é referido como linfonodo sentinela e o mapeamento destes pode antecipar medidas terapêuticas e, conseqüentemente, prolongar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Os objetivos deste experimento foram localizar os linfonodos responsáveis pela drenagem dos cornos e corpo uterino da cadela, verificar relação entre útero e linfonodos ilíacos mediais, e identificar se há ocorrência de reações adversas na cadela devido ao uso do corante azul patente V empregado no procedimento de mapeamento linfático uterino. Primeiramente foram utilizadas cinco cadelas imediatamente após o óbito e 10 cadelas no período transoperatório, com infusão do corante azul patente na subserosa uterina, 10 minutos antes da ovariectomia (OEH), realizando a fotodocumentação. Em seguida, 7 das cadelas submetidas ao mapeamento no transoperatório foram comparadas com 7 cadelas submetidas apenas à OEH, sendo ambos os grupos avaliados quanto à pressão arterial sistólica, durante todo o procedimento cirúrgico, hemogasometria arterial no pré e pós-operatório imediato, e perfil bioquímico no pré-operatório e 7 dias após o procedimento cirúrgico. Pode-se observar que a cadeia de linfonodos ilíacos recebe grande parte da drenagem uterina (cornos) e pode ser considerada em estudos para a sanidade deste órgão, permitindo inferir que alterações desses linfonodos tenham uma possível correlação com afecções uterinas. Não foram constatadas reações adversas no trans e pós-operatório relacionado ao uso do corante nos animais submetidos ao mapeamento.

Palavras-chave: Anafilaxia. Canino. Linfonodos. Necrópsia. Útero.

JUSTINO, Rebeca Cordeiro. **The lymphatic mapping of uterine horns and body in bitches using patent blue V dye V.** 2014. 65 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The first lymph node to receive drainage from a particular body region is referred to as sentinel lymph node and the mapping of these therapeutic measures can anticipate and thus prolong survival and improve quality of life of patients. However, there is the possibility of adverse reactions when it makes use of these vital dyes. No data were found in the searched databases, which aimed uterine lymphatic mapping in dogs using the patent or isosulfan blue dye. The objectives of this experiment were to locate the lymph nodes responsible for draining the uterine horns and body of the bitch and establish relationship between uterus and medial iliac lymph nodes, and finally, to identify if there are adverse reactions in dogs due to the use of patent blue V dye employed in the uterine lymphatic mapping procedure. Firstly, five bitches were used immediately after death and then 10 bitches during the perioperative period, with infusion of the patent blue dye in the uterine subserosal, 10 minutes before ovariohysterectomy (OEH), performing photo documentation. Then 7 bitches subjected to mapping during surgery were compared with 7 bitches submitted just the OEH, with both groups were evaluated for systolic blood pressure throughout the surgical procedure, arterial blood gas pre and immediate post-operative and biochemical profile preoperatively and 7 days after surgery. It was observed that the chain of iliac lymph nodes receives a large part of the uterine horns draining and can be considered in studies for the health of this organ, allowing to infer that changes to those nodes have a possible correlation with uterine disorders. They were not observed any signs of adverse reactions associated with the use of the dye in animals subjected to mapping.

Key words: Anaphylaxis. Canine. Lymph Nodes. Necropsy. Uterus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1 - Lymphatic drainage of the canine uterus demonstrated with patent blue V dye

Figura 1 – Uterine infusion of blue dye in experiment using canine cadavers	42
Figura 2 – Uterine infusion of the blue dye in experiment during ovariohysterectomy in bitch.....	43
Figura 3 – Detailed inspection of the bitch cadavers	44
Figura 4 – Comparison of results obtained from cadavers and animals during surgery in bitch.....	44
Figura 5 – Retroperitoneal region with blue stained lymphatic tissues in two different bitches.....	45
Figura 6 – Drainage of uterine body of bitch.....	45
Figura 7 – Drainage of cranial and medial area of uterine horns in bitch.....	46

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2 - Identificação de reação de hipersensibilidade em cadelas durante o mapeamento linfático uterino utilizando o corante azul patente V

Tabela 1 – Média (\pm Desvio Padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos (alaninoamino transferase, fosfatase alcalina, proteína total e albumina) no pré-operatório e após 7 dias, de sete cadelas do grupo PBV (submetidas ao mapeamento linfático uterino com corante azul patente V e OEH) e sete cadelas do grupo controle (submetidas a OEH). Londrina, 201361

Tabela 2 – Média (\pm Desvio Padrão) dos parâmetros hemogasométricos (pressão parcial de oxigênio, saturação de oxigênio, pressão parcial de gás carbônico e concentração de bicarbonato) no pré e pós-operatório imediato, de sete cadelas do grupo PBV (submetidas ao mapeamento linfático uterino com corante azul patente V e OEH) e sete cadelas do grupo controle (submetidas a OEH). Londrina, 2013.61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OHE	Ovariohisterectomia
ALT	Alanino Aminotransferase
IgE	Imunoglobulina E
TVT	Tumor Venereo Transmissível
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
FcεRI	Receptor de alta afinidade para IgE
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
SO ₂	Saturação de oxihemoglobina
HCO ₃	Bicarbonato
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 SISTEMA REPRODUTIVO - ÚTERO	17
3.1.1 Anatomofisiologia	17
3.1.2 Afecções Uterinas	18
3.2 SISTEMA LINFÁTICO - LINFONODOS RETROPERITONEAIS	19
3.3 MAPEAMENTO LINFÁTICO.....	21
3.3.1 Corantes	22
3.4 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE	23
3.4.1 Hipersensibilidade Tipo I	23
3.4.2 Reação de Hipersensibilidade aos Corantes Azuis.....	24
REFERÊNCIAS	25
5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	32
ARTIGO 1 – Lymphatic drainage of the canine uterus demonstrated with patent blue V dye	33
ABSTRACT	33
INTRODUCTION	33
MATERIAL AND METHODS	35
RESULTS	36
DISCUSSION	37
REFERENCES	39
FIGURES	42

ARTIGO 2 – Identificação de reação de hipersensibilidade em cadelas durante o mapeamento linfático uterino utilizando o corante azul patente V	47
RESUMO	48
CONTEXTO	49
MATERIAL E MÉTODOS	50
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57
TABELAS	61
6 CONCLUSÕES GERAIS	62
ANEXOS	63
Anexo A - Comitê de ética e experimentação animal	64
Anexo B - Certificado de tradução do Artigo 1	65

1 INTRODUÇÃO

Em razão das várias habilidades que possui, o cão é cada vez mais requisitado para exercer atividades de utilidade pública, como guia de deficientes visuais, farejador de entorpecentes e explosivos, auxiliar na busca de vítimas de soterramento e no tratamento de pessoas com doenças físicas e psíquicas. A criação de cães também é uma atividade econômica e o melhoramento genético e a melhoria do manejo de reprodutores representa maior lucro para o setor. Veterinários são cada vez mais requisitados para resolver problemas de fertilidade em cães, tanto por motivos sentimentais quanto financeiros. O cão ainda tem a importante função de servir como modelo experimental para diversas pesquisas, inclusive em estudos relacionados ao mapeamento linfático (FAGUNDES; TAHA, 2004; KAHLENBERG et al., 2001; SCHANAIDER et al., 2004; WANG et al., 2001).

O diagnóstico precoce de doenças tem sido o alvo de diversas pesquisas, pois permite menor tempo de tratamento, sendo este mais eficaz e, em muitos casos, menos radical. O diagnóstico precoce também tem influência no prognóstico, aumentando a expectativa e melhorando a qualidade de vida.

Devido às funções do sistema linfático, como transporte de material de degradação e filtração da linfa, o estudo das alterações que podem ocorrer neste tecido pode proporcionar informações importantes para o diagnóstico precoce de inúmeras afecções (BUDRAS, 2007; TANIS et al., 2001).

O primeiro linfonodo que recebe a drenagem de uma região específica do corpo é referido como o linfonodo sentinela da região em questão (CABANAS, 1977; WELLS et al., 2006).

Pesquisas foram realizadas para estabelecer o melhor método para localizar os linfonodos que drenam o útero de mulheres, devido a alta incidência de neoplasias cervicais malignas. Diferentemente dos inúmeros casos de neoplasia uterina em mulheres, as neoplasias uterinas malignas são raras na espécie canina, ocorrendo em animais de meia idade a idosas, sem predisposição racial, sendo a maioria um achado incidental na necropsia. Entretanto, alterações inflamatórias e infecciosas são frequentes nas cadelas.

O complexo hiperplasia endometrial cística (HEC) – piometra é uma das afecções mais comuns na rotina clínica de pequenos animais e, embora possa se manifestar em qualquer idade, 66% tem idade acima de 9 anos (NISKANEM;

THRUSFIELD, 1998). A contaminação bacteriana no útero pode resultar em bacteremia/toxemia potencialmente fatal (FELDMAN; NELSON, 2004a).

A endometrite é descrita como a inflamação da mucosa uterina, sem associação com alterações ultrassonográficas. Corresponde a ruptura do epitélio endometrial, infiltração de células inflamatórias, congestão vascular e edema estromal (FONTAINE et al., 2009). Cadelas com endometrite crônica possuem fertilidade comprometida, podem apresentar ciclos ovarianos normais, ovulam e tem óvulos fertilizados, porém falham em manter a gestação devido ao ambiente uterino anormal, que impede a implantação ou resulta na reabsorção fetal. Alguns autores já relacionaram a endometrite com a infertilidade em cadelas (FONTAINE et al., 2009; MIR et al., 2013).

Levando em consideração as afecções uterinas mais frequentes em cadelas pode-se inferir que, a partir da localização dos principais linfonodos que drenam o útero dessa espécie, exames auxiliares envolvendo esses linfonodos poderão ser realizados, como ultrassonografia, citologia aspirativa e biópsias. As alterações nas características destes linfonodos podem auxiliar no diagnóstico e prognóstico de afecções uterinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Demonstrar, por meio da técnica de infusão de corante azul patente, quais os linfonodos que envolvidos na drenagem inicial dos cornos e corpo uterino da cadela.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Localizar anátomo-topograficamente os linfonodos sentinelas uterinos.

- Estabelecer relação entre a técnica de mapeamento utilizando o corante azul patente em animais vivos e em cadáveres.

- Identificar por meio de avaliações cardiovasculares e bioquímicas a ocorrência de reações adversas ao corante empregado.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SISTEMA REPRODUTIVO - ÚTERO

3.1.1 Anatomofisiologia

O útero é formado pela cérvix, pelo corpo e por dois cornos. O tamanho uterino nas cadelas varia consideravelmente dependendo da raça, idade e tamanho do animal, número de partos e fase do ciclo estral (EVANS; DE LAHUNTA, 2013). O peso uterino máximo ocorre no início do diestro e decai quando a cadela entra no anestro, quando os cornos uterinos se apresentam relativamente menores (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). Em cadelas de médio porte, sexualmente maduras, não prenhas, os cornos uterinos apresentam 12 cm de comprimento e o corpo uterino 2 a 3 cm de comprimento (BUDRAS et al., 2007).

A cérvix é composta pelo canal cervical envolto por musculatura lisa e possui cerca de 1,5 a 2 cm de comprimento. Pode projetar-se de 0,5 a 1 cm para dentro da vagina, mas mantém a posição abdominal, o que permite sua palpação por via abdominal durante proestro e estro (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

O útero é innervado por ramos simpáticos dos plexos uterino e pélvico. É irrigado pelas artérias ovarianas e uterinas. O ramo uterino da artéria ovariana se une a artéria uterina, um dos ramos principais da artéria vaginal. A artéria entra no mesométrio ao nível do colo do útero. Ao entrar no ligamento largo, o artéria se encontra relativamente próximo com o corpo do útero (EVANS; DE LAHUNTA, 2013).

A parede uterina consiste de três camadas sobrepostas: endométrio, miométrio e perimétrio (BUDRAS et al., 2007). O endométrio uterino é revestido por células com típica função secretória e glândulas sinuosas e ramificadas (BARAU et al., 1975). As glândulas endometriais apresentam grande proliferação durante o diestro, com enovelamento e novas bifurcações em glândulas basais. Ao fim do diestro e no anestro a espessura do epitélio glandular diminui (BARAU et al., 1975). As secreções produzidas pelas glândulas endometriais fornecem um ambiente favorável para a sobrevivência e capacitação espermática, bem como para clivagem

do blastocisto jovem, antes da implantação (DANIEL; KRISHNAN, 1969; ENGLAND et al., 2013).

3.1.2 Afecções Uterinas

O complexo hiperplasia endometrial cística (HEC) – piometra é uma das afecções mais comuns na rotina clínica de pequenos animais e, embora possa se manifestar em cadelas de qualquer idade, 66% apresentam idade acima de 9 anos (NISKANEM; THRUSFIELD, 1998).

A piometra é uma das enfermidades mais atendidas no setor de emergência de clínicas e hospitais veterinários. É uma alteração hormonalmente mediada, principalmente pela ação da progesterona e, portanto, observada no diestro. A contaminação bacteriana no útero pode resultar em bacteremia/ toxemia potencialmente fatal (FELDMAN; NELSON, 2004a).

Bigliardi e colaboradores (2004) identificaram uma correlação positiva entre as alterações histológicas uterinas detectadas em 45 cadelas submetidas à castração, devido a suspeita clínica de piometra (hipertermia, polidipsia, vômito, diarreia, poliúria e prostração), com as alterações ultrassonográficas no útero (exsudato e hiperplasia endometrial cística).

A endometrite é descrita como a inflamação da mucosa uterina, sem associação com mudanças ultrassonográficas (FONTAINE et al., 2009). De acordo com Czernobilsky (1978) a endometrite pode ser classificada em três categorias: aguda, crônica ou fibrótica. A endometrite crônica é a mais observada e tem como sinal patognomônico a infiltração de plasmócitos no endométrio, que pode estar acompanhado de outros elementos da inflamação. Como a endometrite é considerada uma das causas de infertilidade em diversas espécies, como equina, bovina e humana (CZERNOBILSKY, 1978; GILBERT et. al., 2005; HURTGEN, 2006), tem-se inferido que isto também ocorra nas cadelas (FONTAINE et al, 2009; MIR et al., 2013).

Dois fatores são sugeridos para iniciar essa inflamação: a presença de sêmen após cópula ou inseminação artificial e a contaminação bacteriana proveniente da vagina (FREEMAN et al., 2013; RIBEIRO et. al., 2006; WATSON, 2000).

Cadelas com endometrite crônica provavelmente são inférteis, embora apresentem ciclos ovarianos, ovulação e fertilização normais, falham em manter a gestação devido ao ambiente uterino anormal, impedindo a implantação ou resultando na morte embrionária precoce (FELDMAN; NELSON, 2004b; MIR et al., 2013).

Fontaine e colaboradores (2009) realizaram lavado uterino de 26 cadelas em diferentes fases do ciclo estral com histórico de infertilidade. Após a cultura bacteriana e exame citológico diagnosticaram endometrite em 38% das fêmeas, de acordo com os parâmetros de contagem leucocitária e cultura bacteriana (MARSELOO et. al., 2004; WATTS; WRIGHT; LEE, 1998).

Neoplasias uterinas malignas epiteliais são raras na espécie canina, ocorrendo em animais de meia idade a idosas, sem predisposição racial, sendo a maioria um achado incidental na necropsia (KLEIN, 2007).

Alguns artigos relatam a ocorrência de hemangiossarcomas, adenocarcinomas e leiomiossarcoma (BALKA; SZABÓ; JAKAB, 2011; JOEHI et. al., 1967; TSIOLI et. al., 2011; WENZLOW et. al., 2009).

O prognóstico para os leiomiossarcomas e outros tumores malignos é sempre reservado até que haja o resultado do exame histopatológico e o estadiamento da neoplasia. Em casos de metástases ou tumores que possuem aderências a outros órgãos, impossibilitando a retirada, o prognóstico é péssimo (KLEIN, 2007).

O tratamento consiste da excisão do tumor, juntamente com o órgão pela ovariectomia (OEH). Entretanto, não são relatados estudos que visem a pesquisa de metástases para os linfonodos responsáveis pela drenagem linfática uterina.

3.2 SISTEMA LINFÁTICO - LINFONODOS RETROPERITONEAIS

O sistema linfático é uma via acessória da circulação sanguínea, permitindo que os líquidos dos espaços intersticiais possam fluir para o sangue sob a forma de linfa. Os vasos linfáticos podem transportar proteínas e mesmo partículas grandes que não poderiam ser removidas dos espaços teciduais pelos capilares sanguíneos (RODRIGUES, 2003).

Chretien e colaboradores, em 1967, realizaram estudo com infusão intravenosa de corante *pontamine blue*, com o intuito de estudar posteriormente o efeito da linfadenectomia nos cães. O corante permitiu a localização mais rápida e fácil do tecido linfático.

Os linfonodos são recobertos por uma camada de tecido conjuntivo que envia trabéculas ao corpo do linfonodo. A linfa flui no linfonodo pelos vasos aferentes que a despejam abaixo da cápsula, deixando os linfonodos pelos vasos eferentes, que saem na área do hilo (COLVILLE e BASSERT, 2010).

O ovário, a tuba uterina e o terço cranial dos cornos uterinos são drenados para os linfonodos aórticos lombares. O terço médio e caudal dos cornos, o corpo, a cérvix e a vagina drenam para os ilíacos mediais e sacrais. Quanto a localização anatômica, os linfonodos aórticos lombares se apresentam em uma distribuição irregular ao longo da artéria aorta abdominal e recebem uma pequena parte da drenagem dos linfonodos ilíacos mediais, enquanto que os seus vasos eferentes se abrem dentro da cisterna do quilo (BUDRAS et al., 2007).

O linfonodo ilíaco medial está localizado adjacente à aorta, próximo à origem da artéria ilíaca circunflexa profunda, os vasos linfáticos aferentes deste provem do linfonodo inguinal superficial e recebem a drenagem proveniente da parede pélvica e abdominal, do reto, da bexiga e dos membros pélvicos. A maior parte dos vasos eferentes drena para o tronco lombar e para a cisterna do quilo (BEZUIDENHOUT, 1993; BUDRAS et al., 2007).

O linfonodo sacral está localizado no ângulo de origem entre as artérias ilíacas internas. Drena porções do reto e órgãos genitais que estão próximas e também a região das vértebras sacrococcígeas, assim como as áreas mais profundas dos membros pélvicos. Os vasos eferentes drenam para os linfonodos ilíacos mediais (BUDRAS et al., 2007).

Uma das principais funções do sistema linfoide é o reconhecimento de antígenos e a produção de anticorpos, e essa interação antígeno-célula linfóide gera diferentes respostas no linfonodo, que podem colaborar para o diagnóstico da linfadenopatia (MURAMOTO et al., 2011). A linfadenomegalia é uma das alterações mais comuns quando há estímulo antigênico e pode ser devido a vários fatores, como maior demanda linfocitária, por infiltração de células inflamatórias, proliferação *in situ* de linfócitos malignos e macrófagos e por infiltração metastática (CHAMMAS; SAITO; CERRI, 2004).

3.3 MAPEAMENTO LINFÁTICO

A primeira citação sobre mapeamento linfático foi realizada com injeção de corante índigo carmim no nível da válvula ileocecal, descrita por Braithwaite em 1923 (FREITAS, 2007). Cabanas (1977) realizou um estudo em pacientes portadores de câncer peniano, utilizando linfangiogramas, disseções anatômicas e avaliações microscópicas. Os linfangiogramas foram realizados nos vasos linfáticos dorsais ao pênis e demonstraram a existência de um linfonodo central específico, chamado linfonodo sentinela, que pareceu ser o primeiro local de metástase proveniente do carcinoma peniano.

Os métodos propostos para tentar estabelecer a ordenação da drenagem linfática fisiológica são: localização anatômica, corante vital, substância radioativa e linfocintilografia e método combinado (AQUINO et al., 2012; BAUM, 1918 apud CHRETIEN et al, 1967; CABANAS, 1977; WELLS et al., 2006).

Wong, Cagle e Morton (1991) redefiniram o conceito de linfonodo-sentinela, levando em conta a ordem de progressão das células tumorais na cadeia linfática. Eles desenvolveram modelo experimental injetando o corante azul isosulfan em pata de felinos para a pesquisa do linfonodo sentinela na drenagem linfática da pele destes animais, com o objetivo de provar a viabilidade de realizar a linfadenectomia seletiva.

Kahlenberg e colaboradores (2001) utilizaram o isosulfan para a determinação da drenagem linfática na região da veia porta em cães, com um foco no prognóstico de câncer de colo retal, demonstraram as alterações fisiológicas sofridas pelo animal, no momento em que o corante foi injetado, no trans-operatório e após sete dias.

A drenagem linfática do útero é complexa e múltiplos nódulos linfáticos estão envolvidos. Eles estão localizados próximos aos vasos obturador, ilíacos, cava e aorta e também no tecido parametrial e no espaço pré-sacral. O propósito do mapeamento linfático é então identificar os nódulos sentinelas que podem ser representativos em relação ao resto dos linfonodos que drenam a região ou o tumor (KHOURY-COLLADO; ABU-RUSTUM, 2008).

Alguns estudos foram realizados para estabelecer o melhor método para localizar os linfonodos que drenam o útero de mulheres. Burke e colaboradores (1996) e Echt e colaboradores (1999) injetaram o corante isosulfan no miométrio

uterino. Outros colaboradores utilizaram, além do isosulfan, o radiocolóide filtrado tenécio-99 (BATS et al., 2007; BATS et al., 2011; HAUSPY et al., 2007; LEVENBACK et al., 2002). O azul de metileno foi usado em estudo feito por Bin Li e colaboradores (2007).

As técnicas usadas para identificar os linfonodos sentinelas se resumem, em relação ao local da injeção, a três categorias principais: subserosal uterina, cervical e endometrial via histeroscopia (KHOURY-COLLADO; ABURUSTUM, 2008).

Em um estudo com cadáveres humanos, utilizando infusão de polímero com corante na subserosa de corpo uterino e cérvix, foram localizados satisfatoriamente tanto vasos linfáticos quanto linfonodos (LÉCURU et al., 1996).

3.3.1 Corantes Utilizados

Os corantes que apresentam maior número de estudos relacionados ao mapeamento linfático em humanos e animais são os corantes azuis (AQUINO et al., 2012; CHINTAMANI et al., 2011; ENWILLER et al., 2003; HIRSCH et al., 1982; KAHLENBERG et al., 2001; SKELLEY et al., 1964; WONG et al., 1991). Dentre esses, o azul de isosulfan e o azul patente V são os mais utilizados atualmente na prática clínica (BATS et al., 2011; VIEHL et al., 2013).

O azul de isosulfan um sal monossódico de um corante de trifenilmetano 2,5 dissulfonado que pode se ligar fracamente a albumina e é captado seletivamente pelos vasos linfáticos, sendo estes destacados em uma cor azul brilhante, tornando-se discerníveis do tecido adjacente. É o único corante que tem a aprovação de uso em humanos pela entidade *Food and Drugs Administration* (HIRSCH et al., 1982).

De acordo com informações que constam na bula do produto o Bleu Patente V® (Delpharm Tours, Chambray Les Tours, France) é uma solução aquosa de azul patente V, estéril e tamponada à concentração de 2,5%, através de fosfato monossódico. Essa solução é tornada isotônica pela adição de cloreto de sódio. O azul patente V é um corante da família do trifenilmetano e quimicamente corresponde ao sal sódico do bis (dietilamino-4-fenil) (hidroxi-5-dissulfo-2,4-fenil) metanol anidrido.

O azul patente V e seu isômero, o isosulfan, pertencem à família de corantes trifenilmetano, que é amplamente utilizada para colorir tecidos, tintas, cosméticos, alimentos (E131) e medicamentos, como laxantes (MONTGOMERY et al., 2002).

Apesar da extensa utilização dos corantes azuis, existem alguns estudos utilizando outros pigmentos, como a hemosiderina (PINHEIRO et al., 2009), fluoresceína (WELLS et al., 2006), clorofilina (WANG et al., 2001) e carvão ativado (YOKOTA et al., 2000).

3.4 REAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE

Hipersensibilidade se refere às reações excessivas produzidas pelo sistema imune. Reações de hipersensibilidade podem ser divididas em quatro tipos: tipo I, tipo II, tipo III e tipo IV, baseada nos mecanismos envolvidos e tempo em que ocorre a reação. Frequentemente, uma condição clínica em particular pode envolver mais de um tipo de reação (ENSINA et al., 2009).

3.4.1 Hipersensibilidade Tipo I

Reações do tipo I resultam da síntese de IgE específica, contra um determinado antígeno. A interação deste antígeno com a IgE específica ligada aos mastócitos ou basófilos via receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI) leva à liberação de mediadores pré-formados (histamina, triptase, etc) e neo-formados (prostaglandinas, leucotrienos, PAF, etc) (HUNTER et al., 2008). Estas reações, geralmente, ocorrem dentro de 20 a 30 minutos após a administração do fármaco e podem manifestar-se por urticária, edema laríngeo, broncoespasmo, hipotensão e colapso cardiovascular (ENSINA et al., 2009).

Embora a prevalência da anafilaxia em pequenos animais seja desconhecida, reações anafiláticas têm sido observadas com maior frequência, provavelmente devido ao crescente número de substâncias antigênicas aos quais os pacientes são expostos, tanto como ferramentas diagnósticas como modalidades terapêuticas (SHMUEL; CORTES, 2013).

Cães, usualmente, exibem sinais relacionados ao sistema circulatório. A hipotensão e colapso cardiovascular são observados frequentemente,

assim como sinais de alterações hepáticas, enquanto sinais de comprometimento respiratório são menos comuns (DOWLING, 2009; QUANTZ et al., 2009).

O tratamento sintomático é realizado com anti-histamínicos que bloqueiam receptores de histamina. O início tardio de sinais de alergia, particularmente, bronco constrição que é mediada por leucotrienos, são tratados com bloqueadores de receptores de leucotrieno ou inibidores de cicloxigenase (ENSINA et al., 2009).

3.4.2 Reação de Hipersensibilidade aos Corantes Azuis

O uso extensivo dos corantes azul patente V e azul de isosulfan para fins de mapeamento linfático tem sido acompanhado por diversos relatos de intensas reações adversas, embora comumente associado com mecanismos mediados por IgE, os mecanismos subjacentes a estas reações ainda não foram esclarecidos (HUNTING et al., 2010). Na literatura internacional diversos relatos de reação anafilática foram descritos em humanos (BRICOU et al., 2009; HOU-CHUAN LAI et al., 2011; HUNTING et al., 2010; JEUDY et al., 2008; LUCAS et al., 2010).

De acordo com estudo realizado em humanos por Hirsch e colaboradores (1982) apesar de ocorrerem casos de reações alérgicas correlacionados com a aplicação de corantes azuis misturados a anestésicos locais, essas reações também ocorrem quando somente o corante é utilizado, o que demonstra que o corante em si é um alérgeno em potencial.

Não foram encontrados relatos de reações adversas em cães utilizando o corante azul patente. No Brasil foram descritos em humanos alguns relatos de reações adversas devido à utilização do corante azul patente. Todos relataram reações de hipersensibilidade, sendo descrito eritema cutâneo, hipotensão, taquicardia e declínio da saturação de oxigênio. Como medida terapêutica nos três casos, foi instituída a administração de efedrina e/ou adrenalina, hidrocortisona e difenidramina (DEL MASSA; GRION; GHANAME, 2005; RODRIGUES et al., 2010; SHINZATO et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- AQUINO, J. U.; PINHEIRO, L. G. P.; VASQUES, P. H. D.; ROCHA, J. I. X.; CRUZ, D. A.; BESERRA, H. E. O.; CAVALCANTE, R. V. Experimental canine model for sentinel lymph node biopsy in the vulva using technetium and patent blue dye. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 102-108, Feb. 2012.
- BALKA, G.; SZABÓ, L.; JAKAB, C. First report of an endometrial adenoacanthoma in a dog. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapeste, v. 59, n. 2, p. 225-236, jun. 2011.
- BARRAU, M. D.; ABEL, J. H.; VERHAGE, H. G.; TIETZ, W. J. Development of the endometrium during the estrous cycle in the bitch. **American Journal of Anatomy**, v. 142, n. 1, p. 47-65, 1975.
- BATS, A. S.; BUÉNERD, A.; QUERLEU, D.; LEBLANC, E.; DARAI, E.; MORICE, P.; MARRET, H.; GILLAIZEAU, F.; MATHEVET, P.; LÉCURU, F. Diagnostic value of intraoperative examination of sentinel lymph node in early cervical cancer: a prospective, multicenter study. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 123, n. 2, p. 230-235, nov. 2011.
- BATS, A. S.; CLÉMENT, D.; LAROUSSERIE, F.; LEFRÈRE-BELDA, M. A.; FARAGGI, M.; FROISSART, M.; LÉCURU, F. Sentinel lymph node biopsy improves staging in early cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 105, n. 1, p.189-193, Apr. 2007.
- BAUM, H. Das lymphgefasssystem des hundes. **Archiv fur wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde**, Berlim n. 44, p. 521-650, 1918.
- BEZUIDENHOUT, A. J. The lymphatic system. In: EVANS, H. E. **Miller's Anatomy of the Dog**, 4rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 535–560, 2013.
- BIGLIARDI, E.; PARMIGIANI, E.; CAVIRANI, S.; LUPPI, A.; BONATI, L.; CORRADI, A. A Ultrasonography and cystic hyperplasia–pyometra complex in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 39, v. 3, p. 136–140, 2004.
- BIN, LI; XIAO-GUANG, LI; LING-YING, WU; WEN-HUA, ZHANG; SHU-MIN, LI; CHENG, MIN; JU-ZHEN, GAO. A pilot study of sentinel lymph nodes identification in patients with endometrial cancer. **Bulletin du Câncer**, Paris, v. 94, n. 1, p.1-4, 2007.
- BRICOU, A.; BARRANGER, E.; UZAN, S.; DARAI, E. Anaphylactic shock during the sentinel lymph node procedure for cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 114, n. 2, p.375-376, Aug. 2009.
- BUDRAS, K.D.; MCCARTHY, P. H.; HOROWITZ, A.; BERG, R.; FRICKE, W.; RICHTER, R. **Anatomy of the dog**. 5th ed. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co., 2007.
- BURKE, T. W.; LEVENBACK, C.; TORNOS, C.; MORRIS, M.; WHARTON, J. T.; GERSHENSON, D. M. Intraabdominal lymphatic mapping to direct selective pelvic and paraaortic lymphadenectomy in women with high-risk endometrial cancer: results

of a pilot study. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 62, n. 2, p. 169-173, Aug. 1996.

CABANAS, R. M. An approach for the treatment of penile carcinoma. **Cancer**, New York, v. 39, n. 2, p. 456-466, 1977.

CHAMMAS, M. C.; SAITO, O. C.; CERRI, G. G. Linfonodos cervicais. In: SAITO, O. C. **Ultra-sonografia de pequenas partes**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. p. 155-170.

CHINTAMANI; TANDON, M.; MISHRA, A.; AGARWAL, U.; SAXENA, S. Sentinel lymph node biopsy using dye alone method is reliable and accurate even after neo-adjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer-a prospective study. **World journal of surgical oncology**, v. 9, n. 1, p. 19, 2011.

CHRETIEN, P. B.; BEHAR, R. J.; KOHN, Z.; MOLDOVANU, G.; MILLER, D. G.; LAWRENCE, W. The canine lymphoid system: a study of the effect of surgical excision. **The Anatomical Record**, United States, v. 159, n.1, p. 5-15, 1967.

COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010

CZERNOBILSKY, B. Endometritis and infertility. **Fertility and Sterility**. v. 30, n.2, p. 119–130, Aug. 1978.

DANIEL, J. C.; KRISHNAN, R. S. Studies on the relationship between uterine fluid components and the diapausing state of blastocysts from mammals having delayed implantation. **The Journal of experimental zoology**, 172: 267–281, 1969.

DE BOSSCHERE, H.; DUCATELLE, R.; VERMEIRSCH, H.; VAN DEN BROECK, W.; CORYN, M. Cystic endometrial hyperplasia-piometra complex in the bitch: Should the two entities disconnected? **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 55, n. 7, p. 1509-1519, 2001.

DEL MASSA, E. C.; GRION, L. F. C.; GHANAME, N. S. Reação alérgica ao corante azul patente. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 123, sup.esp., p. 53, 2005.

DOWLING, P. M. Anaphylaxis. In: SILVERSTEIN, D. C.; HOPPER, K. **Small Animal Critical Care Medicine**. St Louis: Saunders Elsevier, 2009, pp. 727–730.

ECHT, M. L.; FINAN, M. A.; HOFFMAN, M. S.; KLINE, R.C.; ROBERTS, W. S.; FIORICA, J. V. Detection of sentinel lymph nodes with lymphazurin in cervical, uterine, and vulvar malignancies. **Southern Medical Journal**, v. 92, n. 2, p. 204-208, Feb. 1999.

ENGLAND, G.C.W.; RUSSO, M.; FREEMAN, S.L. The bitch uterine response to semen deposition and its modification by male accessory gland secretions. **The Veterinary Journal**, v. 195, p.179–184, 2013.

ENSINA, L. F.; FERNANDES, F. R.; DI GESU, G.; MALAMAN, M. F.; CHAVARRIA, M. L.; BERND, L. Reações de hipersensibilidade a medicamentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 32, n.2, p. 42-47, 2009.

ENWILLER, T. M.; RADLINSKY, M. G.; MASON, D. E.; ROUSH, J. K. Popliteal and mesenteric lymph node injection with methylene blue for coloration of the thoracic duct in dogs. **Veterinary surgery**, v. 32, n. 4, p. 359-364, 2003.

EVANS, H. E.; DE LAHUNTA, A. The Urogenital System. In: _____. **Miller's Anatomy of the Dog**. 4rd ed. St Louis: Saunders, 2013, Chap. 9, p. 391-393.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Cystic endometrial hyperplasia/ pyometra complex. In: _____. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3rd ed. St Louis: Saunders, 2004 a. Chap. 23, p. 852.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Infertility, associated breeding disorders, and disorders of sexual development. In: _____. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3rd ed. St Louis: Saunders, 2004 b. Chap. 24, p. 877.

FONTAINE, E.; LEVY, X.; GRELLET, A.; LUC, A.; BERNEX, F.; BOULOUIS, H. J.; FONTBONNE, A. Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlím, v. 44, Supl. 2, p. 196-199, Jul. 2009.

FREITAS, A. H. A. **Pesquisa de linfonodo-sentinela em pacientes com adenocarcinoma de cólon**. 2007. 77 p. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

FREEMAN, S.L.; GREEN, M.J.; ENGLAND, G.C.W. Uterine fluid from bitches with mating-induced endometritis reduces the attachment of spermatozoa to the uterine epithelium. **The Veterinary Journal**, v.198, p.76–80, 2013.

GILBERT, R. O.; SHIN, S. T.; GUARD, C. L.; ERB, H. N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows original research article. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 64, n. 9, p. 1879-1888. Dec. 2005.

HAUSPY, J.; BEINER, M.; HARLEY, I.; EHRLICH, L.; RASTY, G.; COVENS, A. Sentinel lymph nodes in early stage cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, New York, v. 105, n. 2, p. 285-290, May. 2007.

HIRSCH, J. I., TISNADO, J., CHO, S. R., BEACHLEY, M. C. Use of isosulfan blue for identification of lymphatic vessels: experimental and clinical evaluation. **American Journal of Roentgenology**, United States, v. 139, n. 6, p. 1061-1064, 1982.

HOU-CHUAN, L.; HUAN-MING, H.; CHEN-HWAN, C.; SHINN-LONG, L.; CHING-WU, T.; JYH-CHERNG, Y.; CHANG, C.-Y. Interference of patent blue dye with pulse oximetry readings, methemoglobin measurements, and blue urine in sentinel lymph node mapping: a case report and review of the literature. **Acta Anaesthesiologica Taiwanica**, Taipei, v. 49, n. 4, p. 162-164, Dec. 2011.

HUNTER, M. J.; VRATIMOS, A. P.; HOUSDEN, J. E.; HELM, B. A. Generation of canine-human Fc IgE chimeric antibodies for the determination of the canine IgE

domain of interaction with FcεR1α. **Molecular immunology**, v.45, n.8, p.2262-2268, 2008.

HUNTING, A. S.; NOPP, A.; JOHANSSON, S. G.; ANDERSEN, F.; WILHELMSEN, V.; GUTTORMSEN, A. B. Anaphylaxis to patent blue VI: clinical aspects. **Allergy**, Copenhagen, v. 65, n. 1, p. 117-23, Jan. 2010.

HURTGEN, J. P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review original research article. **Theriogenology**, Los Altos, California, v. 66, n. 3, p. 560-566, Aug. 2006.

JEUDY, G.; LOUVIER, N.; RAPENNES, T.; GOUJON, E.; FRAISSE, J.; DALACRAT, S.; COLLET, E. Immediate patent blue-induced hypersensitivity during sentinel node detection: The value of cutaneous tests. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, Paris, v. 135, n. 6/7, p. 461-465, Jun./Jul. 2008.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Disorders of the canine uterus and uterine tubes (oviducts). In: _____. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2001. p. 207.

JOSHI, K. V.; SARDESHPANDE, P. D.; JALNAPURKAR, B. V.; AJINKYA, S. M. A case of uterine adenocarcinoma in dog. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 44, n. 2, p. 114-116, Feb. 1967.

KAHLENBERG, M. S.; KANE, J. M.; KANTER, P. M.; WEBER, T. K.; GIBBS, J. F.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A.; PETRELLI, N. J. Hepatic lymphatic mapping: a pilot study for porta hepatis lymph node identification. **Cancer Investigation**, London, v. 19, n. 3, p. 256-260, 2001.

KHOURY-COLLADO, F.; ABU-RUSTUM, N. R. Lymphatic mapping in endometrial cancer: a literature review of current techniques and results. **Internacional Ginecológico Cancer Society**, Cambridge, v. 18, n.6, p. 1163-1168, Nov./Dec. 2008.

KLEIN, M. K. Tumors of the female reproductive system. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2007. p. 614.

LÉCURU, F.; NEJI, K.; ROBIN, F.; DARLES, C.; DE BIÈVRE, P.; TAURELLE, R. J. Lymphatic drainage of the uterus: preliminary results of an experimental study. **Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, Paris, v. 26, n. 4, p. 418-423, 1997.

LEVENBACK, C.; COLEMAN, R. L.; BURKE, T. W.; LIN, W. M.; ERDMAN, W.; DEEVERS, M.; DELPASSAND, E. S. Lymphatic mapping and sentinel node Identification in patients with cervix cancer undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 20, n. 3, p. 688-693, Feb. 2002.

LUCAS, N.; BENAY INTERNE, S.; LAINE, P.; NICOLIE, B.; FONDRINIER, E. Choc anaphylactique et bleu patente : à propos de quatre cas et revue de la littérature.

Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction, Paris, v. 39, n. 2, p. 116-120, Apr. 2010.

MARSELOO, N.; COT, S.; TUAL-VAURS, C.; PETIT, J.; FRONTZAK, N.; FONTBONNE, A. Study of the aerobic bacterial flora in the anterior vagina of breeding bitches with reproductive disorders and its sensitivity to marbofloxacin. In: EVSSAR CONGRESS, 4., Barcelona, 2004. **Anais...** Barcelona, 2004. p. 327.

MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; GOBELLO, C. The canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G., VERSTGEGEN, J., LINDE-FORSBERG, C. (Ed.). **Recent advances in small animal reproduction**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 2005.

MIR, F.; FONTAINE, E.; ALBARIC, O.; GREER, M.; VANNIER, F.; SCHLAFER, D.H.; FONTBONNE, A. Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: an observational study. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 79, n. 2, p. 312–322, 2013.

MONTGOMERY, L. L.; THORNE, A. C.; VAN ZEE, K. J.; FEY, J.; HEERDT, A. S.; GEMIGNANI, M.; PORT, E.; PETREK, J.; CODY, H. S. 3rd; BORGAN, P. I. Isosulfan blue dye reactions during sentinel lymph node mapping for breast cancer. **Anesthesia and Analgesia**, v.95, n.2, p.385-388, 2002.

MURAMOTO, C.; STERMAN, F. A.; HAGEN, S. C. F.; FONSECAPINTO, A. C. B. C.; OLIVEIRA, C. M.; FAUSTINO, M.; TALIB, M. S. F.; TORRES, L. N. Avaliação ultrassonográfica de linfonodos na pesquisa de metástases de neoplasia mamária em cadelas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 1006-1013, 2011.

NISKANEM, M.; THRUSFIELD, M. V. Association between age, parity, hormonal therapy and breed and pyometra in finnish dogs. **Veterinary Records**, v. 143, n. 18, p. 493- 498, 1998.

PINHEIRO, L. G. P.; OLIVEIRA FILHO, R. S. D.; VASQUES, P. H. D.; FILGUEIRA, P. H. D. O.; ARAGÃO, D. H. P.; BARBOSA, P. M. E.; BESERRA, H. E. O.; CAVALCANTE, R. V. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 6, p. 432-436, 2009.

PRESTES, N. C. Semiologia do sistema reprodutor feminino. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: ROCA, 2004.

QUANTZ, J. E.; MILES, M. S.; REED, A. L.; WHITE, G. A. Elevation of alanine transaminase and gallbladder wall abnormalities as biomarkers of anaphylaxis in canine hypersensitivity patients. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.19, p.536-544, 2009.

RIBEIRO, A.; VICENTE, W.; APPARICIO, M.; GADELHA, C.; ALVES, A.; COVIZZI, G. Uterine leucocyte infiltration after artificial insemination in bitches. **Theriogenology**, Los Altos, Califórnia, v. 66, p. 1462–1464, 2006.

RODRIGUES, C. F. S. Anatomia aplicada do sistema linfático. In: PITTA, G. B. B.; CASTRO, A. A.; BURIHAN, E. (Ed.). **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA; 2003.

RODRIGUES, M. A. P. A.; MAZONI, A. C. O.; CARNEIRO, P. C. A.; HAEFFNER, J. C.; NETO, A. A. Efeito adverso do corante azul patente em paciente com câncer de mama, submetida à segmentectomia e biópsia de linfonodo sentinela (LS): relato de caso. **Revista Associação Médica Fluminense**, Niteroi, v. 18, jun./ago. 2010.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, p. 441-7, 2004.

SHINZATO, J. Y.; MARCACCINI, A. C. P.; BRAGA, A. F. A.; RIBEIRO, A. R.; RUBIO, J. E. M.; SOUZA, J. P. D. Reação anafilática ao corante azul patente durante a biópsia do linfonodo sentinela em câncer de mama inicial: relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 728-732, 2006.

SHMUEL, D. L.; CORTES, Y. Anaphylaxis in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 4, p. 377-394, 2013.

SKELLEY, J. F.; PRICE, J. E.; KOEHLER, R. Applications of direct lymphangiography in the dog. **American Journal of Veterinary Research**, v.25, p.747-755, 1964.

TANIS, P. J.; NIEWEG, O. E.; VALDÉS OLMOS, R. A.; RUTGERS, E. J. Th; KROON, B. B. History of sentinel node and validation of the technique. **Breast Cancer Research**, v. 3, p. 109-112, 2001.

TSIOLI, V. G.; GOULETSOU, P. G.; LOUKOPOULOS, P.; ZAVLARIS, M.; GALATOS, A. D. Uterine leiomyosarcoma and pyometra in a dog. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 121-124, Feb. 2011.

VIEHL, C. T.; GULLER, U.; LANGER, I.; LAFFER, U.; OERTLI, D.; ZUBER, M. Factors influencing the success of in vivo sentinel lymph node procedure in colon cancer patients: Swiss prospective, multicenter study sentinel lymph node procedure in colon cancer. **World Journal of Surgery**, v.37, n.4, p.873-877, April 2013.

WANG, H.; TAN, Y.; WANG, X.; XIE, J. Identification of pelvic lymph nodes with chlorophyllin after injection into the uterine cervix: An experimental and clinical study. **Lymphology**, v. 34, n. 2, p. 69-76, 2001.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, n. 60-61, p. 221-232, Jul. 2000.

WATTS, J.; WRIGHT, P.; LEE, C. Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v 39, v. 1, p. 2-9, 1998.

WELLS, S.; BENNETT, A.; WALSH, P.; OWENS, S. AND PEAUROI, J. Clinical usefulness of intradermal fluorescein and patent blue violet dyes for sentinel lymph

node identification in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**. v 4(2), pp 114-122. Jun, 2006.

WENZLOW, N.; TIVERS, M. S.; SELMIC, L. E.; SCURRELL, E. J.; BAINES, S. J.; SMITH, K. C. Haemangiosarcoma in the uterine remnant of a spayed female dog. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 50, n. 9, p. 488-491, Sep. 2009.

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

YOKOTA, T.; SAITO, T.; NARUSHIMA, Y.; IWAMOTO, K.; IIZUKA, M.; HAGIWARA, A.; SAWAI, K.; KIKUCHI, S.; KUNII, Y.; YAMAUCHI, H. Lymph-node staining with activated carbon CH40: a new method for axillary lymph-node dissection in breast cancer. **Canadian Journal of Surgery**, v. 43, n. 3, p. 191, 2000.

4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

MANUSCRITO 1

Lymphatic drainage of the canine uterus demonstrated with patent blue V dye

Normas do Periódico: Journal of Anatomy

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1469-7580/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1469-7580/homepage/ForAuthors.html)

Lymphatic drainage of the canine uterus demonstrated with patent blue V dye

ABSTRACT

Different methods for lymphatic mapping in dogs, such as infusing tissues with vital dyes, have been studied, with the aim at the early detection of lymph node metastasis. The objectives of this experiment were to locate the lymph nodes responsible for draining the uterine body and horns and to try to establish the relationship between the uterus and the medial iliac lymph nodes to contribute to the early diagnosis and prognosis of uterine disorders. We studied 15 bitches divided into two groups (5 immediately after dead and 10 during surgery). The dye used was patent blue V (Patente Bleu V ®). The results obtained from the examining the animals during surgery were consistent with those obtained from the cadavers. It was observed that the iliac lymph node chain receives the most part of the uterine (horns) drainage. The uterine body also appeared to drain into the internal iliac and sacral lymph nodes, due to the path of the dye in the lymphatic vessels. The cranial region of the uterine horns also displayed a different pattern of drainage, probably to the aortic lymph nodes. This information suggests that evaluating these lymph nodes will allow correlating changes in their physiological status with uterine pathologies.

Key-words: sacral lymph, aortic lymph, vital dye, bitches, cadavers

INTRODUCTION

Studies involving lymphatic drainage were initially undertaken by dissection (Baum 1918), which served as a base for anatomy books (Budras et al. 2007, Bezuidenhout 2013). Later, radiographic contrast studies using radiopaque substances, such as ethiodol, were performed, with the same aim (Fischer & Zimmerman 1959, Skelley et al. 1964). Moreover, many investigations have been conducted to establish techniques for locating the sentinel nodes (Gould et al. 1960, Wong et al. 1991).

The blue dye infusing into tissue has been used since the first decades of the last century and allows visualization of the lymphatic vessels and lymph nodes (Sanders & Florey 1940). This process is due to two basic principles of lymphatic physiology, the existence of an orderly and predictable pattern of drainage to a regional lymph node and the characteristic filtering function of the first lymph node (Tanis et al. 2001). Cabanas (1977) was one of the first to use the term sentinel node, demonstrating the existence of a specific central node, which proved to be the first site of metastasis from penile carcinoma.

Due to the high incidence of uterine cancer in humans, several studies were conducted to acquire more accurate knowledge about the lymphatic drainage of this organ (Burke et al. 1996, Echt et al. 1999, Levenback et al. 2002, Altgassen et al. 2007, Bin Li et al. 2007). Uterine malignant epithelial neoplasms are rare in dogs, most of which are discovered as incidental findings at autopsy (Klein 2007). Some papers have reported the occurrence of hemangiosarcomas, adenocarcinoma and leiomyosarcoma (Cave et al. 2002, Wenzlow et al. 2009, Tsioli et al. 2011).

In contrast, cases of canine uterus infection and inflammation are very common (Watts et al. 1998, Pretzer 2008, Fontaine et al. 2009), due the physiology of the reproductive cycle, in which this organ is exposed to progesterone for a particularly long period (Johnston et al. 2001). Although the etiology of endometritis is not entirely clear, it was associated with infertility in the bitch (Fontaine et al. 2009). Studies have intensified to establish reliable prognostic factors that might also be used to reach an early diagnosis of uterine diseases (Weiss et al. 2004, Sant'Anna 2012, Mir et al. 2013).

It is known that lymph nodes receives drainage from specific regions of the body and responds in a particular manner to each type of disease. Reactive or hyperplastic lymph nodes receive this classification due to the historic increase of the same and lymphoid proliferation in response to antigenic stimulation (Cowell et al. 2003).

Assessment of sentinel lymph nodes by observing changes in their characteristics in cases of uterine disorders in dogs could facilitate early diagnosis and establish patterns for utilization in non-invasive auxiliary exams. Therefore, the objectives of this experiment were to locate the nodes responsible for draining the uterine body and horns of the bitches and try to establish a relationship between the uterus and the medial iliac lymph nodes.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the Institutional animal ethics (n°183/12). All procedures were authorized by owners.

Animals and dye

We used 15 mongrel healthy bitches, 1 to 15 years old (4.1 ± 3.45), weighing between 6 and 15 kg (8.3 ± 3.19), belonging to clients. These animals were divided into two distinct experimental groups. The first group was formed by five bitches from the emergency care sector, recently euthanized due to irreversible complications in systems other than the reproductive. The second one consisted of 10 bitches designed to ovariohysterectomy (OEH) elective, requested by owner.

The dye used was the patent blue V (Bleu Patente V®, Delpharm Tours, Chambray Les Tours, France). According to the patient information leaflet, Patent Bleu V ® (Delpharm Tours, Chambray Les Tours, France) is a sterile aqueous solution of patent blue V at a concentration of 2.5% in buffered monosodium phosphate and isotonic by the addition of sodium chloride.

Experiment with cadavers

Immediately after euthanasia, abdominal cavity was accessed, the uterus was located and isolated. An aliquot of 0.2 mL of patent blue was injected into subserosal layer of each horn medial third and uterine body, totaling 0.6 mL (Fig. 1). After 10 minutes, the dyed structures were dissected for photo documentation and identification (adapted technique Lécuru et al. 1997). The lymph nodes were processed for histology. Formalin fixed tissues were prepared following standard histological techniques and embedded in paraffin. Tissue sections of 5- μ m thick were stained using Harris hematoxylin and eosin (HE). The histological sections were examined by light microscopy

Experiment with alive bitches

All bitches underwent preoperative tests (complete blood cell count and biochemical profile). Sedation was achieved using acepromazine (0.03 mg/kg) and

morphine (0.5 mg/kg), both administered intramuscularly 30 minutes before the procedure. Anesthetic induction was accomplished with propofol (5 mg/kg IV) intravenously and maintained with isoflurane inhalation. The perioperative analgesia was provided by ketoprofen (1 mg/kg) subcutaneous injection. A celiotomy was performed and the uterus was located and isolated. Using a 1ml syringe and a 26G needle, 0.4 mL of patent blue was injected into the subserosal layer of each uterine horn (middle third) and in uterine body, both inventral surface (Fig. 2). After injections, the site was massaged, and 5 minutes afterward, the cavity was inspected to locate the nodes responsible for uterine drainage (surgical technique adapted from Altgassen et al. 2007). After the inspection and photo documentation, we applied the standard technique of ovariectomy.

Data analysis

Due to the descriptive focus of this study, no statistical tests were performed. Instead, detailed description of the employed techniques and photo documentation of the results were realized.

RESULTS

Study on cadavers allowed to observe the lymphatic vessels and lymph nodes after 10 minutes of dye application. The abdominal cavity was inspected with emphasis on the retroperitoneal region and it was found that mainly part of uterine horns lymphatic drainage was received by medial iliac lymph nodes. It was possible to perform a more detailed inspection in the cadavers, including dissecting and removing the dyed structures for histological confirmation that they were lymphatic tissues (Fig. 3).

The results obtained from examining the animals during surgery were consistent with those obtained from the cadavers. The blue dye filled the lymphatic vessels along the uterine broad ligament (Fig. 4).

In the experimental group using live dogs there were not intraoperative complications. During surgery, the turquoise color was observed below the peritoneum and within adipose tissue, five minutes after dye application, mostly derived from the uterine horns, due to the observation of the dye within the lymphatic

vessels. The stained region was compatible with the anatomical region where medial iliac lymph nodes are located (Fig. 5).

The medial iliac lymph nodes were not the unique lymph nodes that became stained. The uterine body also appeared to drain into the internal iliac and sacral lymph nodes, due to the path of the dye in the lymphatic vessels (Fig. 6). The cranial region of the uterine horns also displayed a different pattern of drainage, probably to the aortic lymph nodes (Fig. 7).

All of the bitches used in the intraoperative experiment had bluish urine within three days following procedure. In some bitches, the blue urine was noticed in the immediate postoperative period.

DISCUSSION

The lymphatic drainage of the canine uterus is described in anatomy books, based on dissection, and superficially in article which focuses on human lymphatic mapping and uses the dog as an experimental model (Baum 1918, Wang et al. 2001, Budras et al. 2007, Bezuidenhout 2013). In humans the uterine lymphatic mapping is describe as being directed to the pelvic lymph nodes denominated paraaortics (Burke et al. 1996, Wang et al., 2001). However, according Bezuidenhout (2013), the drainage in the bitch is made by the lumbar lymph center and the iliosacral lymph center. The only study found that cited lymphatic mapping of the canine uterus by dye was performed using a different infusion technique and pigment (Wang et al., 2001). Their intent was to study the behavior of the chlorophyllin, its pharmacokinetics and effect on human physiology. There is no reference to medial iliac lymph nodes. The results obtained from cadavers were satisfactory and corroborated the hypothesis that the effect obtained in humans could be reproduced in dogs (Lècuru et al., 1997, Ercoli et al., 2010). Lècuru and colleagues (1997) observed a propagation time of the dye into lymphatic vessels and lymph nodes approximately half an hour, while in this experiment the time was only 10 minutes. This may be explained, partly, by specimens body temperature and time postmortem, since this study used animals immediately after death and the French group used thawed cadavers.

The evidence that the pattern of dye diffusion, which we observed in live animals, was repeated in cadavers allowed the use of this technique in studies that involve inspection and manipulation of the lymphatic tissue in the abdominal cavity. Also permits anatomical familiarization and training of diagnostic and therapeutic techniques that approach the medial iliac lymph node (Ercoli et al. 2010). The technical improvement increases the safety of anatomical-topographical location of the medial iliac lymph nodes and their handling, because the region in question is closely linked to the great vessels (aorta and vena cava) and the risk of bleeding is high.

In the experimental group with live bitches the exact anatomical location of lymph nodes that drain the uterus was made difficult by the intense concentration of adipose tissue in the retroperitoneal region. In studies performed in humans, for better observation of these lymph nodes, opening the retroperitoneum was performed (Levenback et al. 2002, Altgassen et al. 2007). As this experiment would not perform any procedure involving the lymph nodes and because the importance of adjacent structures, it was decided not to perform this access.

Another difficulty found in the experiment with live bitches was the direct observation of the sacral lymph nodes. An osteotomy of the pelvis was not performed for better inspection of the pelvic region because the aim of the study, which was to identify lymph nodes that could subsequently be examined using non-invasive methods, such as ultrasonography.

The results showed that the patent blue V dye effectively demonstrating that the medial iliac lymph node chain is the sentinel chain of the uterine horns of bitches.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the Laboratory of Animal Pathology, in the name of Prof. Ana Paula F. R. L. Bracarense, for providing the facilities to carry out the experiment with cadavers. To the Post Graduate Program in Animal Science - UEL, for the financial support. To Coordination of Higher Education Personnel Improvement (CAPES) for granting the master scholarship.

REFERENCES

- Altgassen C, Pagenstecher J, Homung D, Hornemann A (2007) A new approach to label sentinel nodes in endometrial cancer. *Gynecologic oncology* 105, 457-461.
- Baum H (1918) Das lymphgefäßsystem des hundes. *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde* 44, 521-650.
- Bezuidenhout AJ (2013) The lymphatic system. In: Evans HE. *Miller's Anatomy of the Dog*, 4rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 535–560.
- Bin Li, Xiao-Guang Li, Ling-Ying Wu, Wen-Hua Zhang, Shu-Min Li, Cheng Min, et al. (2007) A pilot study of sentinel lymph nodes identification in patients with endometrial cancer. *Bull cancer* 94, 1-4.
- Budras KD, McCarthy PH, Horowitz A, Berg R, Fricke W, Richter R. (2007) Urinary and Genital Organs, Pelvis. In: *Anatomy of the dog*, 5th ed. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.
- Burke TW, Levenback C, Tornos C, Morris M, Wharton JT, Gershenson DM (1996) Intraabdominal lymphatic mapping to direct selective pelvic and paraaortic lymphadenectomy in women with high-risk endometrial cancer: results of a pilot study. *Gynecologic oncology* 62, 169-173.
- Cabanas RM (1977) An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 39, 456-466.
- Cave TA, Hine R, Howie F, Thompson H, Argyle DJ (2002) Uterine carcinoma in a 10-month-old golden retriever. *J small anim pract* 43,133-135.
- Chretien PB, Behar RJ, Kohn Z, Moldovanu G, Miller DG, Lawrence W (1967) The canine lymphoid system: a study of the effect of surgical excision. *The Anatomical Record United States* 159, 5-15.
- Cowell RL, Dorsey KE, Meinkoth JH (2003) Lymph node cytology. *Vet clin north am small anim pract.* 33, 47-67.
- Echt ML, Finan MA, Hoffman MS, Kline RC, Roberts WS, Fiorica JV (1999) Detection of sentinel lymph nodes with lymphazurin in cervical, uterine and vulvar malignancies. *South Med J.* 92, 204-208.
- Ercoli A, Delmas V, Iannone V, Fagotti A, Fanfani F, Corrado G, et al. (2010) The lymphatic drainage of the uterine cervix in adult fresh cadavers: anatomy and surgical implications. *European Journal of Surgical Oncology* 36, 298-303.

- Fischer HW, Zimmerman GR (1959) Roentgenographic visualization of lymphnodes and lymphatic channels. *American journal of roentgenology radium therapy and nuclear medicine* 81, 517-534.
- Fontaine E, Levy X, Grellet A, Luc A, Bernex F, Boulouis HJ, et al. (2009) Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. *Reprod Domest Anim.* 44, 196-199.
- Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH (1960) Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid. *Cancer* 13, 77-78.
- Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS (2001) Disorders of the canine uterus and uterine tubes (oviducts). In *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders, Philadelphia.
- Klein MK (2007) Tumors of the female reproductive system. In Withrow SJ, Vail DM (eds), *Small animal clinical oncology*. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Lécuru F, Neji K, Robin F, Darles C, De Bièvre P, Taurelle RJ (1997) Lymphatic drainage of the uterus. Preliminary results of an experimental study. *Gynecol obstet biol reprod.* 26, 418-423.
- Levenback C, Coleman RL, Burke TW, Lin WM, Erdman W, Deavers M, et al. (2002) Lymphatic mapping and sentinel node identification in patients with cervix cancer undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J Clin Oncol.* 20, 688-693.
- Mir F, Fontaine E, Albaric O, Greer M, Vannier F, Schlafer DH, et al. (2013) Findings in uterine biopsies obtained by laparotomy from bitches with unexplained infertility or pregnancy loss: An observational study. *Theriogenology* 79, 312–322.
- Pretzer SD (2008) Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology* 70, 359-363.
- Sanders AG, Florey HW (1940) The Effects of the Removal of Lymphoid Tissue. *British Journal of Experimental Pathology* 21, 275–287.
- Sant'Anna MC (2012) Avaliação prognóstica da piometra canina. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Skelley JF, Price JE, Koehler R (1964) Applications of direct lymphangiography in the dog. *Am J Vet Res* 25, 747-55.
- Tanis PJ, Nieweg OE, Valdés Olmos RA, Rutgers EJTh, Kroon BB (2001) History of sentinel node and validation of the technique. *Breast Cancer Res* 3, 109-112.

- Tsioli VG, Gouletsou PG, Loukopoulos P, Zavlaris M, Galatos AD (2011) Uterine leiomyosarcoma and pyometra in a dog. *J small anim pract.* 52, 121-124.
- Watts J, Wright P, Lee C (1998) Endometrial cytology of the normal bitch throughout the reproductive cycle. *J Small Anim Pract.* 39, 2–9.
- Weiss RR, Calomeno MA, Sousa RS, Briersdorf SM, Calomeno RA, Muradás P (2004) Avaliação histológica, hormonal e bacteriológica da piometra na cadela. *Archives of veterinary science* 9, 81-87.
- Wenzlow N, Tivers MS, Selmic LE, Scurrrell EJ, Baines SJ, Smith KC (2009) Haemangiosarcoma in the uterine remnant of a spayed female dog. *Small anim pract.* 50, 488-491.
- Wong JH, Cagle LA, Morton DL (1991) Lymphatic drainage of skin to a sentinel lymph node in a feline model. *Ann. Surgery* 214, 637-641.

FIGURES

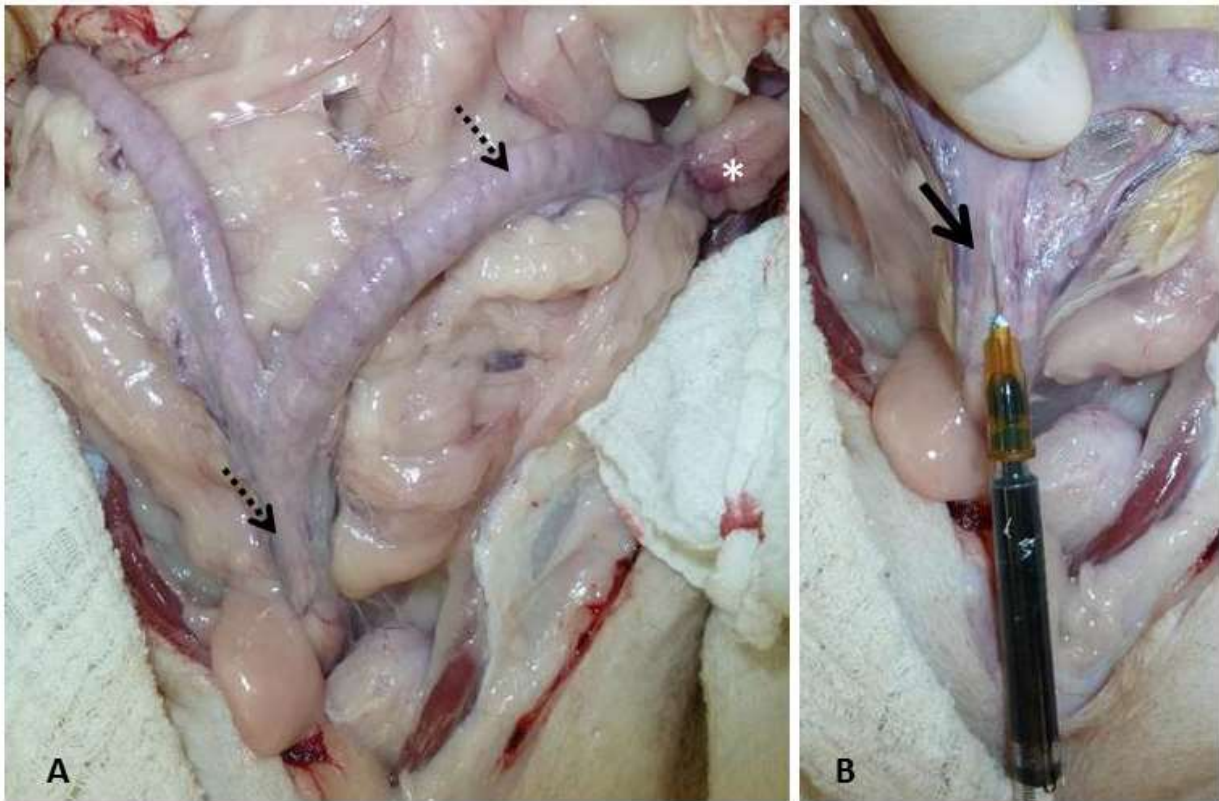


Fig.1. Uterine infusion of blue dye in experiment using canine cadavers. A. Dashed arrows indicate applications sites of patent blue in the uterus body and medial third of the horns. Is possible to observe also the left ovary (*) B. Patent blue V was injected into the subserosal layer of the uterine body (Arrow).

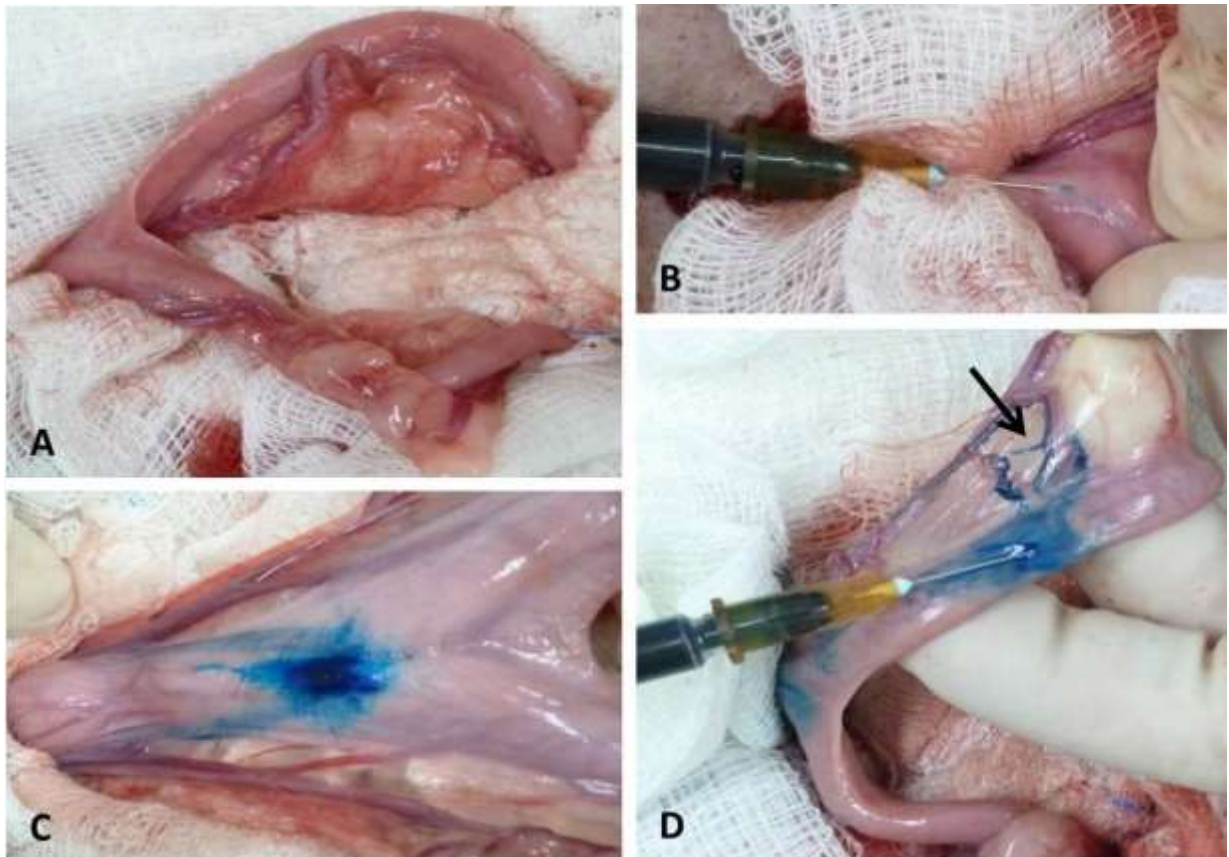


Fig.2. Uterine infusion of the blue dye in experiment during ovariectomy. A. Isolation of uterus. B. Patent blue V infusion into the subserosal layer of the uterine body. C. Dye diffusion through the tissue after application. D. Immediately after application it is possible to observe lymphatic channels (Arrow).

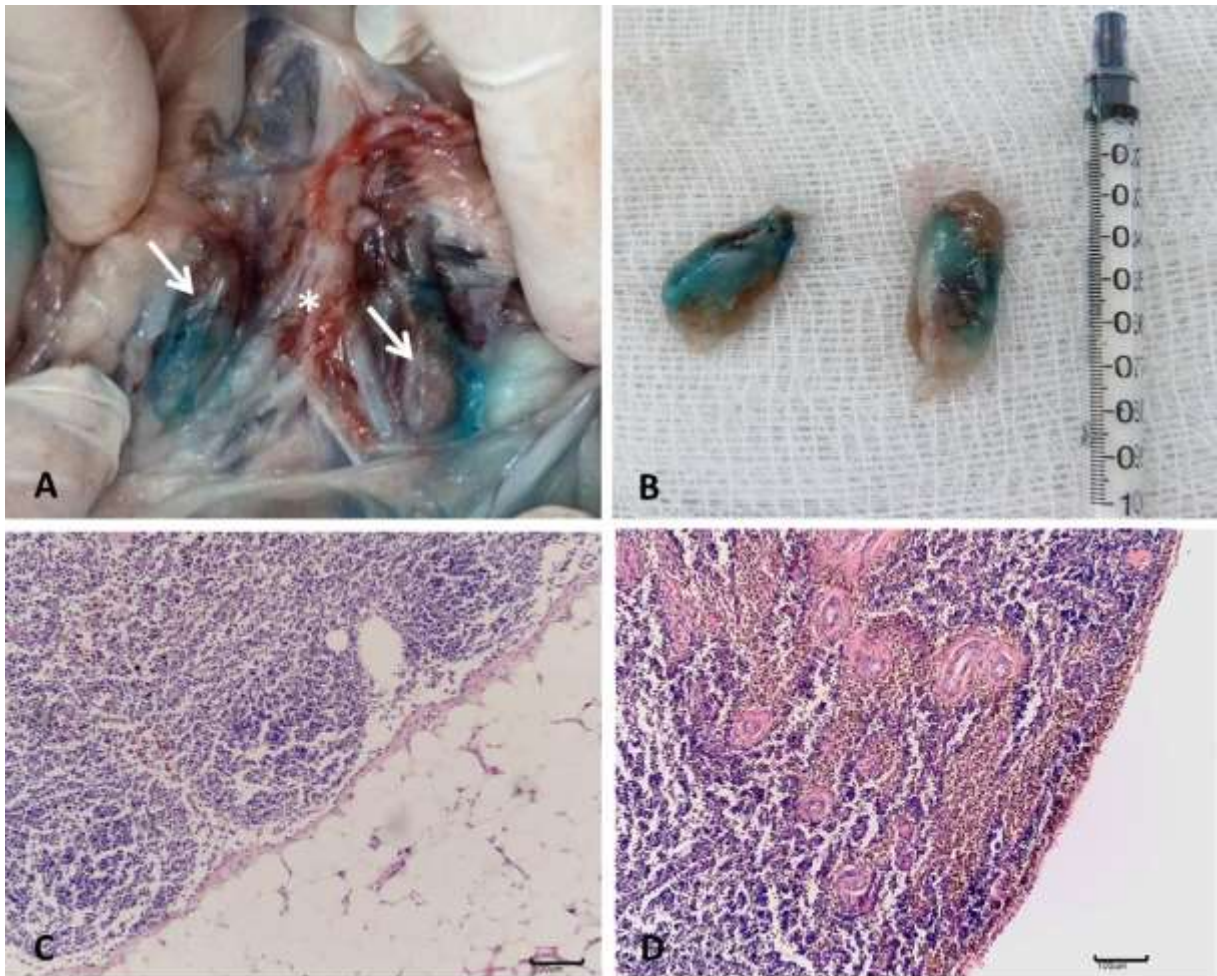


Fig.3. Detailed inspection of the canine cadavers. A. Dissection of stained structures (arrows) adjacent to the bifurcation which originates iliac arteries (*). B. Removal of the dyed structures. C and D. Histological confirmation that were lymphatic tissues (observed in 10x). HE.

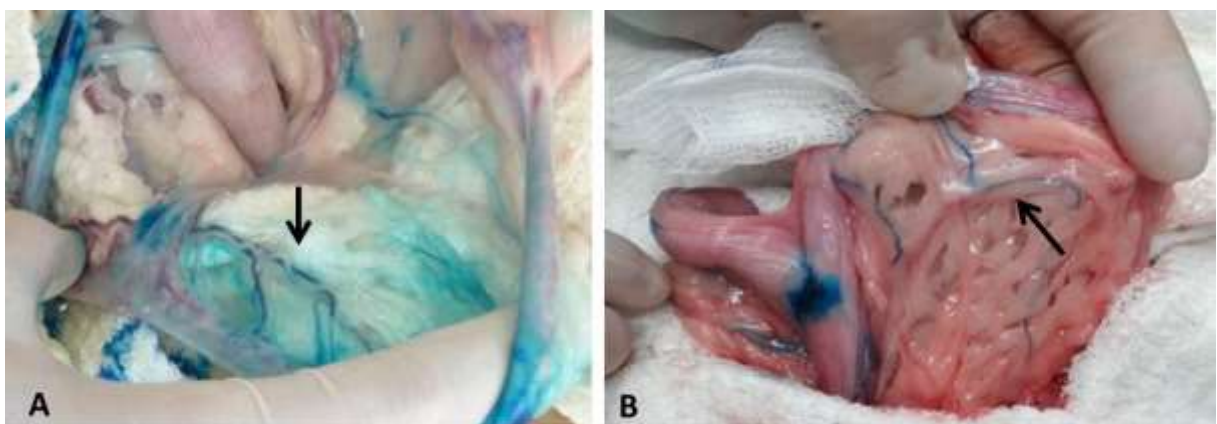


Fig.4. Comparison of results obtained from cadavers (A) and bitches during surgery (B). Arrows indicate lymphatic channels observed. Both stained with patent blue V.

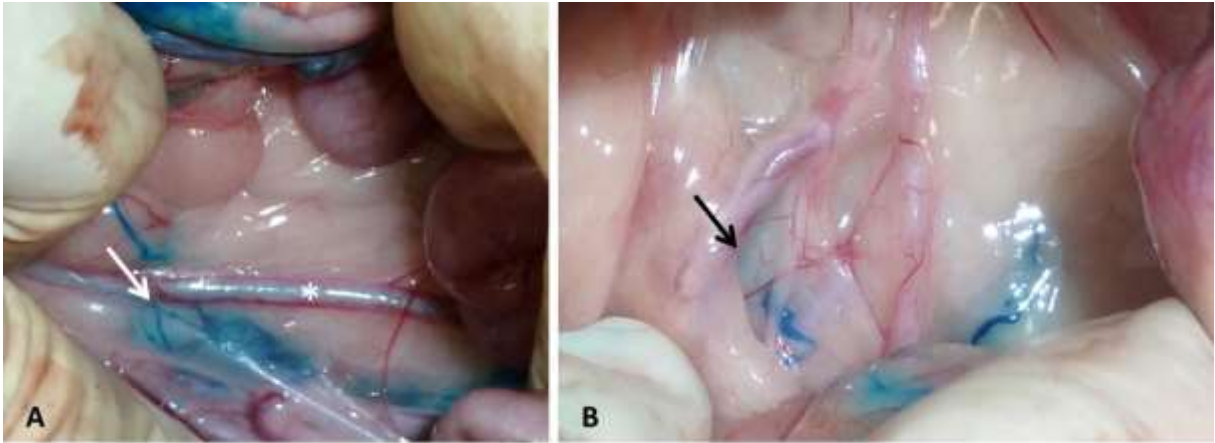


Fig.5. Retroperitoneal region with blue stained lymphatic tissues in two different bitches (A and B). The arrows indicate the region where the medial iliac lymph nodes are probably located. It is possible to observe the ureter (*).

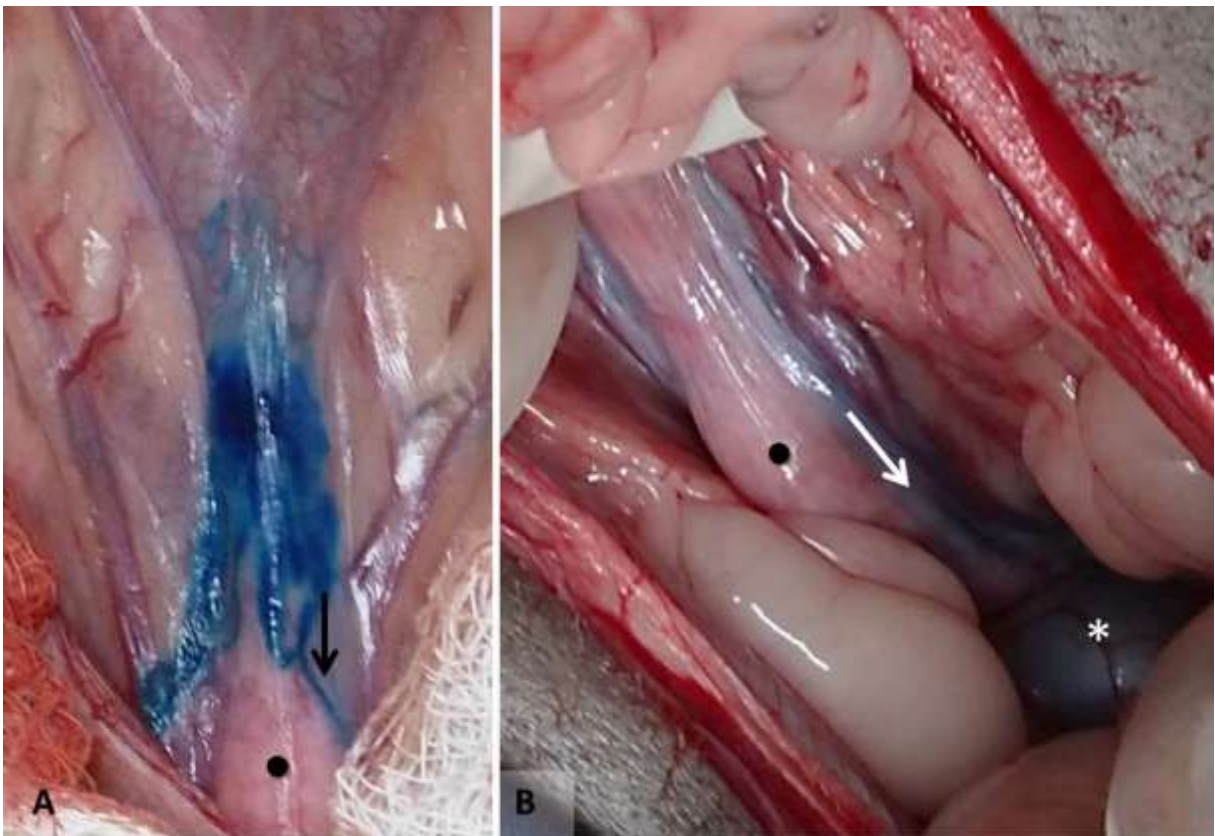


Fig.6. Drainage of canine uterine body. A. and B. Turquoise staining in lymphatic channels that drain into lymph intrapelvic (arrows) observed adjacent to the bladder (*) and cervix (spheres).

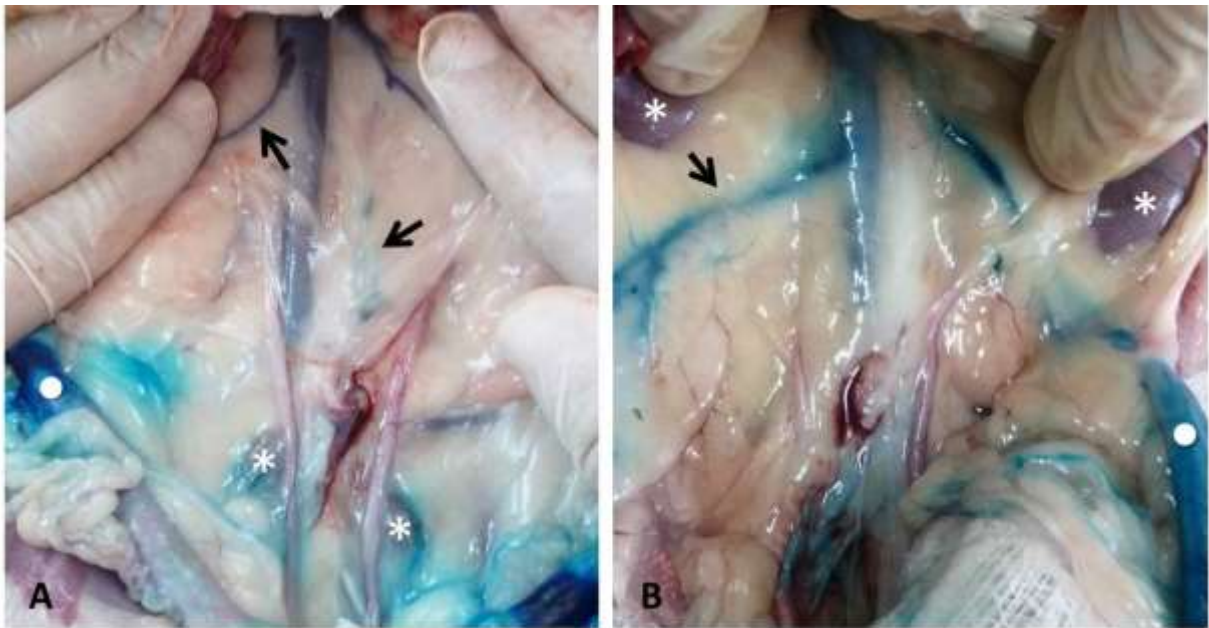


Fig.7. Drainage of cranial and medial area of canine uterine horns. It is possible to observe the uterine horn (spheres), stained lymphatic channels that drain into the renal and aortic lymph nodes (arrows), the medial iliac lymph nodes (A.*) and both kidneys (B.*).

MANUSCRITO 2

“Identificação de reação de hipersensibilidade em cadelas durante o mapeamento linfático uterino utilizando o corante azul patente V”

Normas do periódico: BMC Veterinary Research

<http://www.biomedcentral.com/bmcvetres/authors/instructions/researcharticle>

Identificação de reação de hipersensibilidade em cadelas durante o mapeamento linfático uterino utilizando o corante azul patente V

Resumo

Contexto

O mapeamento linfático tem sido amplamente realizado em humanos, sendo que diversos casos de reações de hipersensibilidade aos corantes utilizados foram descritos. Na espécie canina embora tenha alguns estudos semelhantes, não foram encontrados, na literatura, estudos avaliando as reações adversas durante o procedimento. O objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de reações adversas, baseado em parâmetros cardiovasculares e hematológicos, em cadelas submetidas ao mapeamento linfático uterino utilizando-se o corante azul patente v.

Resultados

Os procedimentos foram realizados em 14 cadelas, divididas aleatoriamente em dois grupos homogêneos (G-PBV - mapeamento linfático e OEH; G-Controle - OEH). A média de duração dos procedimentos para o G-PBV foi de 54,3 minutos e para o G-Controle 42,9 minutos. Dos parâmetros bioquímicos, as variáveis proteínas totais e albumina apresentaram diferenças ($p < 0,05$) entre a avaliação no pré-operatório e sete dias de pós-operatório. Foram observadas diferenças ($p < 0,05$) nos valores da pressão parcial de oxigênio (PO_2) em ambos os grupos, entre as avaliações realizadas no pré e pós-operatório imediato. Enquanto que somente no G-Controle a saturação de oxigênio (SO_2) foi diferente ($p < 0,05$) nos períodos avaliados.

Conclusões

Não foram observadas reações adversas relacionadas a utilização do corante azul patente V em cadelas submetidas ao mapeamento linfático uterino.

Contexto

Embora a prevalência da anafilaxia seja desconhecida em pequenos animais, essas reações têm sido cada vez mais observadas, provavelmente devido ao aumento da exposição dos pacientes a antígenos [1].

Hipotensão e colapso cardiovascular podem ser observados, assim como sinais de alterações hepáticas [2, 3, 4]. As alterações clínicas causadas na reação anafilática são espécies dependentes e associadas às regiões do organismo onde há maior concentração de mastócitos [5, 6]. O trato gastrointestinal e o sistema venoso do fígado são considerados os locais primários do choque, pois na anafilaxia, a histamina liberada do trato gastrintestinal é levada para veia porta, resultando em congestão hepática e hipertensão portal [2, 4].

O azul patente V pertence à família de corantes trifenilmetano, que é utilizada para colorir tecidos, tintas, cosméticos, alimentos (E131) e medicamentos, como laxantes [7, 8]. Este corante também é amplamente utilizado para o mapeamento linfático, tanto para fins clínicos como de pesquisa [9, 10]. O uso do corante azul patente V tem sido acompanhado por diversos relatos de intensas reações adversas [11-15]. Apesar das reações adversas relacionadas ao uso do corante a ser comumente associada a mecanismos mediados por imunoglobulina E (Ig-E), ainda não foram completamente esclarecidos [13].

Todos os indivíduos submetidos ao mapeamento linfático são submetidos a procedimentos anestésicos. Sabe-se que fármacos administrados para fins de anestesia podem interferir nos parâmetros fisiológicos dos animais. O isoflurano é um agente anestésico halogenado inalatório e exerce mínima influência sobre o sistema cardiorespiratório [16]. Este fármaco não sensibiliza o miocárdio à ação das catecolaminas e, por apresentar pouco efeito estimulante β -adrenérgico, diminui a resistência vascular periférica e a pressão arterial [17].

Em relação aos anestésicos locais, apesar de ocorrerem reações de hipersensibilidade em humanos, quando aplicados juntamente com os corantes azuis, essas reações também ocorrem em pacientes submetidos ao mapeamento utilizando-se somente o corante. Os sintomas

comumentos descritos são eritema, hipotensão, taquicardia e declínio na saturação de oxigênio [11-15, 18-21]. Não há relatos de reações adversas associadas ao uso dos corantes azul patente V e isosulfan em cães.

O objetivo deste estudo foi identificar a ocorrência de reações adversas devido a utilização do corante azul patente V em cadelas submetidas ao mapeamento linfático uterino, considerando as avaliações de parâmetros cardiovasculares e hematológicos.

Material e Métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da instituição (n° 183/12). Todos os procedimentos, aos quais os animais foram submetidos, tiveram previa autorização dos proprietários.

Corante

O corante utilizado neste experimento foi o azul patente V (Patente Bleu V®, Delpharm Tours, Chambray Lês Tours – França). De acordo com a bula do produto o Bleu Patente V® é uma solução aquosa de azul patente V, estéril e tamponada à concentração de 2,5%. É um corante da família do trifenilmetano e quimicamente corresponde ao sal sódico do bis (dietilamino-4-fenil) (hidroxi-5-dissulfo-2,4-fenil) metanol anidrido. Qualquer que seja a via de administração, a solução a 2,5% de Bleu Patente V® é eliminada de 24 a 48 horas pela urina e bile.

Animais

Foram usadas 14 cadelas sem raça definida, com idade entre 1 e 6 anos ($2,4 \pm 1,28$), pesando de 7 a 15 kg ($8,6 \pm 3,84$), destinadas a ovariectomia (OEH) eletiva requisitada pelo proprietário. As cadelas foram divididas igualmente em dois grupos (G-PBV-mapeamento linfático uterino e OEH; G-Controle - OEH). O protocolo de anestesia e analgesia, assim como as avaliações cardiovasculares e hematológicas, foi o mesmo para ambos os grupos.

Protocolo anestésico-analgésico

A medicação pré anestésica foi realizada com acepromazina (0,03mg/kg) e morfina (0,5mg/kg), via intramuscular, 30 minutos antes do procedimento. A indução anestésica foi feita com propofol intravenoso (5mg/kg) e a manutenção gasosa com isofluorano. A analgesia transoperatória foi realizada com administração intravenosa de 5 µg/kg de fentanil, 5 minutos antes do pinçamento dos pedículos ovarianos e com cetoprofeno (1mg/kg), via subcutânea. No pós-operatório a analgesia foi mantida com meloxicam (0,1mg/kg), via oral, a cada 24 horas, durante 4 dias.

Grupos experimentais

No grupo submetido ao mapeamento (G-PBV) foi realizada a infusão do corante no útero e posteriormente a ovariohisterectomia (OEH) em sete cadelas. Realizada a celiotomia, o útero foi localizado e a cavidade abdominal isolada. Foi injetado de 0,4 mL de azul patente na camada subserosa do corno e do corpo uterino, utilizando uma seringa de 1 mL acoplada a agulha 26G. Após 10 minutos foi realizada a OEH.

As sete cadelas pertencentes ao grupo controle (G-Controle) foram submetidas ao procedimento de OEH, utilizando a técnica de hemostasia com três pinças, transfixação de pedículos ovarianos e coto uterino e pexia de ligamento largo uterino, utilizando fio não absorvível comercial Nylon 2-0 (Shalon suturas, Goiânia - Brasil).

Parâmetros hematológicos

As amostras de sangue (5ml) foram obtidas pela punção das veias jugular e/ou safena externa, no pré-operatório imediato e após 7 dias, coincidindo com o retorno para reavaliação e retirada de pontos. Os exames realizados foram: hemograma completo, proteína total sérica (PT), albumina (ALB), creatinina sérica (CRE), alanino-amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Todos os exames executados no aparelho Dimension Xpand plus® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc – EUA).

A hemogasometria foi realizada em seguida à intubação do animal e imediatamente após a extubação, o sangue colhido pela punção da artéria femoral interna em seringa heparinizada. Foram aferidas as variáveis: pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (PO₂), em mmHg; pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (PCO₂), em mmHg; saturação de oxihemoglobina no sangue arterial (SO₂), em %; bicarbonato (HCO₃⁻) mmol/L e pH do sangue arterial, utilizando o aparelho de gases sanguíneos OmniC (F. Hoffmann - La Roche Lmta).

Parâmetros cardiovasculares

Os valores de frequência cardíaca foram obtidos por meio da contagem de batimentos por minuto, com aferição a cada cinco minutos, utilizando o estetoscópio esofágico. A pressão arterial sistólica foi obtida empregando-se o Doppler vascular ultrassônico DV-10 (Microem Produtos Médicos Ltda - Brasil) e o esfigmomanômetro, com o manguito adaptado ao membro torácico esquerdo, acima da articulação do cotovelo, também a cada cinco minutos.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney para as variáveis do mesmo animal, comparando os valores do pré e pós-operatório. Para a comparação dos valores entre G-Controle e G- PBV foi realizado primeiramente a obtenção da diferença entre os valores pré e pós de cada grupo e após, as diferenças foram submetidas ao teste de Mann-Whitney. Ambos os testes foram realizados no programa Bioestat 5.0, utilizando nível de significância de 5%.

Resultados

Procedimento cirúrgico

No G-PBV o tempo médio \pm desvio padrão de duração dos procedimentos foi de 54,3 \pm 6,1 minutos. O procedimento realizado no G-Controle teve em média \pm desvio padrão duração de 42,9 \pm 8,6 minutos. Nenhum dos animais submetidos ao procedimento de mapeamento

linfático utilizando o corante azul patente V apresentaram qualquer alteração em parâmetros fisiológicos que indicassem anafilaxia. O efeito adverso observado em todos os animais submetidos ao mapeamento linfático uterino foi a presença de urina azulada que, em alguns casos, foi notada imediatamente após o procedimento cirúrgico.

Parâmetros hematológicos

Os valores médios dos parâmetros bioquímicos séricos estão relacionados na Tabela 1 para o G-PBV e G-Controle. Os valores médios de creatinina para o G-PBV foram: pré 0,97 ($\pm 0,15$) e pós 1,04 ($\pm 0,21$) e no G-Controle os valores médios foram: pré 1,0 ($\pm 0,14$) e pós 1,0 ($\pm 0,19$). Dos parâmetros bioquímicos, foram observadas diferenças na proteína total e albumina ($p < 0,05$) no G-PBV, com valores maiores na avaliação pré quando comparada à pós-operatória. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) quando comparadas as avaliações pré e pós-operatória no G-Controle e quando comparada a diferença entre os dois grupos. Os parâmetros hemogasométricos no pré e no pós-operatório imediato das cadelas, tanto do G-PBV quanto do G-Controle, estão descritas na Tabela 2. Em relação às análises estatísticas, a PO₂ apresentou diferença ($p < 0,05$) no G-PBV e no G-Controle, entre a avaliação pré e pós-operatória. A SO₂ apresentou diferença ($p < 0,05$) apenas no G-Controle, entre o pré e pós-operatório. Em ambos os casos, os valores obtidos no pré foram maiores que os valores encontrados no pós-operatório. As médias e desvios padrões dos valores de pH obtidos do G-Controle foram: pré 7,29 ($\pm 0,05$) e pós 7,30 ($\pm 0,09$) e no G-PBV: 7,31 ($\pm 0,05$) e 7,30 ($\pm 0,04$), momentos pré e pós-operatório respectivamente.

Parâmetros cardiovasculares

Não foram observadas alterações acentuadas nos valores de batimento cardíacos e pressão arterial sistólica durante a monitoração.

Os valores médios de batimento cardíaco dos animais oscilaram entre 93bpm ($\pm 4,51$) a 109 bpm ($\pm 4,66$) no G-PBV e 83bpm ($\pm 2,95$) a 117bpm ($\pm 5,55$) no G-Controle.

A pressão arterial sistólica média dos animais teve as seguintes variações: no G-PBV 90,6mmHg (± 287) a 120,1mmHg ($\pm 3,95$) e no G-Controle 88,7 mmHg ($\pm 1,49$) a 102,4 mmHg ($\pm 3,13$).

Discussão

O amplo uso do corante azul patente V em alimentos, tecidos e medicamentos permite inferir que possivelmente um grande número de indivíduos já foi exposto a este composto, fato que pode explicar parcialmente os numerosos relatos de reação de hipersensibilidade tipo I em humanos submetidos ao mapeamento linfático com este corante, já que essas reações tipicamente ocorrem após a exposição prévia a um alérgeno [7, 13].

O único efeito adverso observado nas cadelas submetidas ao mapeamento linfático uterino foi a presença de urina azulada, alteração esta consistente com informações presentes na bula do fármaco e em relato de caso [12].

Os valores dos parâmetros fisiológicos avaliados se mantiveram dentro dos limites normais [22], indicando claramente que nenhum dos animais apresentou reação de hipersensibilidade ao corante usado, sendo condizente com a falta de relatos na literatura deste tipo de reação, no emprego do corante azul patente V em mapeamento linfático em cães. Mesmo nos casos nos quais houve diferença ($p < 0,05$) entre os valores, como foi observado com as proteínas totais e albumina sérica do G-PBV, essa diferença aparentemente não teve qualquer relevância clínica, já que todos os animais se mantiveram estáveis clinicamente no pós-operatório, sem necessidade de qualquer intervenção terapêutica. O decréscimo na concentração de proteína total e albumina pode ser relacionado à perda de apetite comumente observada após procedimentos invasivos, como é o caso da OEH, mesmo quando há analgesia instituída [23, 24]. Esse achado pode ter relação o tempo cirúrgico mais longo e maior manipulação das estruturas presentes na cavidade abdominal no grupo onde foi realizado o mapeamento

linfático (G-PBV). Isso é corroborado pelo fato que no grupo controle essa diferença não foi observada ($p>0,05$).

Os batimentos cardíacos se mantiveram estáveis durante todo o procedimento cirúrgico, assim como os valores obtidos nas mensurações da pressão arterial mesmo nos períodos imediatamente posteriores à infusão do corante. Nas reações observadas em humanos, grande parte dos pacientes apresentaram sinais poucos minutos após o contato com o corante.

Os valores de ALT se mantiveram dentro dos limites fisiológicos, sem diferença ($p>0,05$) entre as avaliações pré e pós-operatória e entre os grupos, indicando que não houve reação anafilática nas cadelas em que foi realizada a infusão uterina do corante azul patente V, pois já foi demonstrado anteriormente que após uma lesão hepática causada por anafilaxia, os níveis de ALT podem aumentar rapidamente e voltar aos valores normais após 2 a 3 semanas [2].

O azul patente tem sido amplamente utilizado nos procedimentos de mapeamento linfático em pacientes oncológicos humanos. A interferência deste corante na acurácia da aferição de alguns parâmetros monitorados durante a anestesia, como a oximetria de pulso, é uma importante reação adversa [12]. Em estudo realizado em cães para o mapeamento linfático hepático, utilizando o corante isosulfan, foi observado um decréscimo significativo na saturação de oxigênio aferida via transcutânea. Porém, quando foi realizada a hemogasometria, nenhum decréscimo significativo foi encontrado; a diferença entre os resultados desses exames pode ser explicada pela interferência do corante na absorção da onda de luz da oxihemoglobina pelo aparelho de espectrofotometria de pulso (oxímetro de pulso) [12, 25]. No presente experimento, os valores de PO_2 se mantiveram acima dos valores considerados fisiológicos [26]. As diferenças entre as avaliações pré e pós-operatórias, em ambos os grupos, pode ser explicada pelo momento da coleta das amostras, sendo o primeiro

momento coletado após a intubação e o segundo após a extubação. Os animais, enquanto intubados recebiam oxigênio 100%.

Muitos autores descreveram sinais cardiovasculares em seus relatos de hipersensibilidade ao corante em humanos, sendo a hipotensão o mais citado [11, 13, 15, 20]. A reação anafilática causada pelo corante pode ser confundida com a hipotensão comumente observada após a indução anestésica ou o aprofundamento da mesma. A hipotensão causada pela anestesia é revertida devido a estímulo doloroso, superficialização de plano anestésico e ao aumento da fluidoterapia [13]. No presente estudo não foram observados decréscimos nos valores da pressão arterial sistólica que indicasse hipotensão devido à reação ao corante.

É importante salientar que todas as cadelas deste experimento estavam saudáveis, sem qualquer queixa relatada pelo proprietário ou sinais clínicos que indicassem qualquer afecção, diferente dos pacientes humanos descritos nos relatos de reação de hipersensibilidade, que sofriam de doenças crônicas (neoplasias malignas) [27]. Este fato, mesmo não sendo estudado ou discutido por nenhum dos autores consultados, pode ter relevância na ocorrência ou não de reações de anafilaxia.

Conclusões

Este trabalho permite concluir que o corante azul patente V é seguro para o propósito de mapeamento linfático uterino em cadelas saudáveis.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão aos funcionários e residentes do Laboratório de Patologia Clínica e do Centro Cirúrgico - Hospital Veterinário / Universidade Estadual de Londrina (HV / UEL) que auxiliaram na condução do experimento. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UEL, pelo apoio financeiro. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo de mestrado.

Referências

1. Shmuel DL, Cortes Y: **Anaphylaxis in dogs and cats.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2013, **23**: 377-394
2. Quantz JE, Miles MS, Reed AL, White GA: **Elevation of alanine transaminase and gallbladder wall abnormalities as biomarkers of anaphylaxis in canine hypersensitivity patients.** *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2009, **19**:536-544
3. Dowling PM: **Anaphylaxis.** In *Small Animal Critical Care Medicine*. 1st edition. Edited by Silverstein DC and Hopper K. St Louis: Saunders Elsevier; 2009: 727-730
4. Greenway CV, Oshiro G: **Effects of histamine on hepatic volume (outflow block) in anaesthetized dogs.** *British Journal of Pharmacology* 1973, **47**: 282-290
5. Noviana D, Mamba K, Makimura S, Horii Y: **Distribution, histochemical and enzyme histochemical characterization of mast cells in dogs.** *Journal of Molecular Histology* 2004, **35**: 123–132
6. Fujita T: **Characteristic distribution of mast cells in dog liver. a consideration on the mechanism of anaphylactic shock.** *Archivum histologicum Japonicum= Nihon soshikigaku kiroku* 1964, **24**: 435-445
7. Montgomery LL, Thorne AC, Van Zee KJ, Fey J, Heerdt AS, Gemignani M, Port E, Petrek J, Cody HS 3rd, Borgen PI: **Isosulfan blue dye reactions during sentinel lymph node mapping for breast cancer.** *Anesthesia and Analgesia* 2002, **95** (Suppl 2):385-8
8. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): **Scientific Opinion on the safety and efficacy of Patent Blue V (E 131) as feed additive for non food-producing animals.** *EFSA Journal* 2013,**11**:3108

9. Viehl CT, Guller U, Langer I, Laffer U, Oertli D, Zuber M: **Factors influencing the success of in vivo sentinel lymph node procedure in colon cancer patients: Swiss prospective, multicenter study sentinel lymph node procedure in colon cancer.** *World Journal of Surgery* 2013, **37**: 873-877
10. Aquino JU, Pinheiro LGP, Vasques PHD, Rocha JIX, Cruz DA, Beserra HEO, Cavalcante RV: **Experimental canine model for sentinel lymph node biopsy in the vulva using technetium and patent blue dye.** *Acta Cirurgica Brasileira* 2012, **27**: 102-108
11. Bricou A, Barranger E, Uzan S, Darai E: **Anaphylactic shock during the sentinel lymph node procedure for cervical cancer.** *Gynecologic oncology* 2009, **114**:375-376
12. Hou-Chuan Lai, Huan-Ming Hsu, Chen-Hwan Cherng, Shinn-Long Lin, Ching-Tang Wu, Jyh-Cherng Yu, Chun-Chang Yeh: **Interference of patent blue dye with pulse oximetry readings, methemoglobin measurements, and blue urine in sentinel lymph node mapping: a case report and review of the literature.** *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 2011, **49**:162-164
13. Hunting AS, Nop A, Johansson SG, Andersen F, Wilhelmsen V, Guttormsen AB: **Anaphylaxis to patent blue V. I. Clinical aspects.** *Allergy* 2010, **65**:117-123
14. Jeudy G, Louvier N, Rapennes T, Goujon E, Fraisse J, Dalac-Rat S, Collet E: **Immediate patent blue-induced hypersensitivity during sentinel node detection: the value of cutaneous tests.** *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 2008, **135**:461-465
15. Lucas N, Interne SB, Laine P, Nicolie B, Fondrinier E: **Choc anaphylactique et bleu patente: à propos de quatre cas et revue de la littérature.** *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2010, **39**:116-120

16. Conceição EDV, Nishimori CT, Moraes PC, Paula DP, Carareto R, Freitas PMC, Nunes N: **Parâmetros eletrocardiográficos e cardiovasculares em cães anestesiados pelo isoflurano e submetidos à hipovolemia aguda.** *Ciência Rural* 2005, **35**:1351-1356
17. Paget PS, Kampine JP, Schmeling WT, Warltier DC: **Comparison of the systemic and coronary hemodynamic actions of desflurane, isoflurane, halothane, and enflurane in the chronically instrumented dog.** *Anesthesiology* 1991, **74**:539-551
18. Hirsch JI, Tisnado J, Cho SR, Beachley MC: **Use of isosulfan blue for identification of lymphatic vessels: experimental and clinical evaluation.** *American Journal of Roentgenology* 1982, **139**: 1061-1064
19. Del Massa EC, Grion LFC, Ghaname NS: **Reação alérgica ao corante azul patente.** *São Paulo Medical Journal* 2005, **123**:53
20. Shinzato JY, Marcaccini ACP, Braga AFA, Ribeiro AR, Rubio JEM, Souza JPD: **Reação anafilática ao corante azul patente durante a biópsia do linfonodo sentinela em câncer de mama inicial – relato de caso.** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2006, **28**:728-732
21. Rodrigues MAPA, Mazoni ACO, Carneiro PCA, Haeffner JC, Neto AA: **Efeito adverso do corante azul patente em paciente com câncer de mama, submetida à segmentectomia e biópsia de linfonodo sentinela (ls): relato de caso.** *Revista da Associação Médica Fluminense* 2010, **43**:18-19
22. Viana FAB: **Valores bioquímicos de mamíferos domésticos.** In *Guia Terapêutico Veterinário*. 2nd ed. Edited by Viana FAB. Lagoa Santa: Gráfica Editora CEM Ltda; 2007: 339
23. Hardie EM, Hansen BD, Carroll GS: **Behavior after ovariohysterectomy in the dog: what's normal?.** *Applied Animal Behaviour Science* 1997, **51**: 111-128

24. Mathews KA: **Pain assessment and general approach to management.** *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2000, **30**: 729-755
25. Kahlenberg MS, Kane JM, Kanter PM, Weber TK, Gibbs JF, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ: **Hepatic lymphatic mapping: a pilot study for porta hepatis lymph node identification.** *Câncer Investigation* 2001, **19**: 256-260
26. Kaneko JR: **Clinical biochemistry of domestic animal.** In *Clinical biochemistry of domestic animal*. 5th ed. Edited by Kaneko JR. San Diego: Academic 1997: 932
27. Mertes PM, Malinovsky JM, Mouton-Faivre C, Bonnet-Boyer MC, Benhaijoub A, Lavaud F, Valfrey J, O'Brien J, Pirat P, Lalourcey L, Demoly P: **Anaphylaxis to dyes during the perioperative period: reports of 14 clinical cases.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008, **122**: 348-352

Tabelas

Tabela 1 - Média (\pm Desvio Padrão) dos parâmetros bioquímicos séricos (alaninoamino transferase, fosfatase alcalina, proteína total e albumina) no pré-operatório e após 7 dias, de sete cadelas do grupo PBV (submetidas ao mapeamento linfático uterino com corante azul patente V e OEH) e sete cadelas do grupo controle (submetidas a OEH). Londrina, 2013.

Grupos	Parâmetros Bioquímicos							
	ALT (U/L)		FA (U/L)		PT (g/dL)		ALB (g/dL)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
G-PBV	43 ($\pm 12,57$)	41 ($\pm 6,99$)	66 ($\pm 17,93$)	72 ($\pm 38,01$)	7,0* ($\pm 0,71$)	6,4* (0,21)	2,6* ($\pm 0,34$)	2,4* ($\pm 0,31$)
G-Controle	48 ($\pm 16,29$)	45 ($\pm 8,17$)	78 ($\pm 29,38$)	91 ($\pm 23,17$)	6,5 ($\pm 0,87$)	6,7 ($\pm 0,70$)	2,8 ($\pm 0,18$)	2,8 ($\pm 0,19$)

* Valores que apresentaram diferenças ($p < 0,05$) na linha.

Tabela 2 - Média (\pm Desvio Padrão) dos parâmetros hemogasométricos (pressão parcial de oxigênio, saturação de oxigênio, pressão parcial de gás carbônico e concentração de bicarbonato) no pré e pós-operatório imediato, de sete cadelas do grupo PBV (submetidas ao mapeamento linfático uterino com corante azul patente V e OEH) e sete cadelas do grupo controle (submetidas a OEH). Londrina, 2013.

Grupos	Parâmetros hemogasométricos							
	PO ₂ (mmHg)		SO ₂ (%)		PCO ₂ (mmHg)		cHCO ₃ (mmol/L)	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
G-PBV	232,63* ($\pm 121,30$)	98,37* ($\pm 13,20$)	97,63 ($\pm 5,15$)	96,40 ($\pm 1,16$)	42,27 ($\pm 5,43$)	43,71 ($\pm 4,51$)	20,60 ($\pm 1,69$)	21,59 ($\pm 0,86$)
G-Controle	356,81* ($\pm 129,69$)	95,10* ($\pm 13,03$)	99,56* ($\pm 0,91$)	94,97* ($\pm 2,36$)	45,00 ($\pm 5,89$)	45,84 ($\pm 13,75$)	20,77 ($\pm 1,38$)	20,11 ($\pm 2,73$)

* Valores que apresentaram diferenças ($p < 0,05$) na linha.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Os linfonodos ilíacos mediais desempenham importante papel na drenagem linfática dos cornos e corpo uterino da cadela, fato que foi comprovado pelos resultados obtidos com o mapeamento linfático utilizando o corante azul patente V, tanto no transoperatório quanto em cadáveres. Com este experimento também foi possível estabelecer a relação entre a técnica de mapeamento linfático em cadelas anestesiadas e imediatamente após o óbito. Não foram identificados, por meio de avaliações cardiovasculares e bioquímicas, a ocorrência de reações adversas devido ao corante empregado, indicando que o mesmo é seguro para o uso em cães, quando utilizado para o mapeamento linfático uterino na cadela.

ANEXOS

ANEXO A

Comitê de ética e experimentação animal



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 183/12

Londrina, 15 de Agosto de 2012.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL, reunido em 07 de Agosto de 2012, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Mapeamento linfático e pesquisa de linfonodos sentinelas de cornos e corpos uterinos em cadêlas", processo CEUA n°18685, 2012/14, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 32 Cães, fêmeas, de 2 e 10 anos, e peso de 10 a 20 kg, a procedência será de cães que possuem proprietários. O projeto terá o objetivo de localizar os linfonodos responsáveis pela drenagem inicial dos cornos e corpos uterinos da cadela utilizando a técnica de coloração com azul patente. Espera-se contribuir para diagnóstico e prognóstico das alterações uterinas, infecciosas ou neoplásicas, através da avaliação desses linfonodos. Para isso os animais serão divididos em dois grupos G1 e G2. O G1 será formado de 12 cadáveres e o G2 de 20 animais saudáveis. O corante utilizado será o Bleu Patente. O G1 permitirá maior tempo para inspeção de cavidade abdominal e pélvica, dissecação de estrutura e retirada de amostras para histologia, depois de acessada a cavidade abdominal o útero será localizado e isolado, o G2 se prestara para representar situações de transoperatório e utilização do corante *in vitro*. Serão utilizadas 20 cadêlas saudáveis, destinadas a OSH eletiva. Os animais passarão por exames pré-operatórios e serão tranquilizados com acepromazina e doantina todos administrados por via intramuscular. A analgesia será solução de lidocaína sem vaso constritor e morfina. A analgesia do pós-operatório será feita com meloxicam na dose de 0,1 mg/kg, a cada 24 horas e durante 5 dias. O projeto não conterá testes estáticos, pois os projetos contem um estudo que prima pela descrição das características da filosofia linfática do útero canino. O projeto espera localizar os linfonodos responsáveis pela drenagem inicial dos cornos e corpo uterino da cadela e encontra a relação entre útero e os linfonodos ilíacos medidas, para posteriores estudos envolvendo alterações uterinas, inflamatórias e neoplásicas. O desenvolvimento deste projeto prevê publicações de artigos originais sob a técnica de mapeamento linfático em cadáveres. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 24 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me. Cordialmente,

Waldiceu Ap. Vetti Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Vetti Junior
Coordenador CEUA/UEL

Ilma Sra.
Profa. Maria Isabel Mello Martins
Coordenadora do Projeto
Departamento de Clínica Veterinária
Centro de Ciências Agrárias
Cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG).

ANEXO B

Certificado de tradução (Artigo 1)



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Uterine lymphangiography: comparison of two methods in locating the medial iliac lymph node

Authors:

Rebeca C. Justino², Guilherme S. Cardoso², Luiz G. C. Trautwein², Gabriel T. Dessunti², Deise V. Oliveira², Rafael Bernardes, Maria I. M. Martins²

Date Issued:

September 26, 2013

Certificate Verification Key:

08BE-8334-1308-5D27-8282



This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.