

Identificação do linfonodo sentinela utilizando hemossiderina em casos de câncer de mama localmente avançado

Identification of the sentinel lymph node using hemosiderin in locally advanced breast cancer cases

PAULO HENRIQUE WALTER DE AGUIAR, ACBC-CE¹; RANNIERE GURGEL FURTADO DE AQUINO^{1,4}; MAYARA MAIA ALVES²; JULIO MARCUS SOUSA CORREIA³; AYANE LAYNE DE SOUSA OLIVEIRA⁴; ANTÔNIO BRAZIL VIANA JÚNIOR⁵; LUIZ GONZAGA PORTO PINHEIRO, ECBC-CE¹.

R E S U M O

Objetivo: verificar a taxa de concordância na identificação do linfonodo sentinela utilizando um marcador autólogo rico em hemossiderina e o Tecnécio 99 (Tc99) em casos de câncer de mama localmente avançados. **Métodos:** ensaio clínico fase 1, do tipo prospectivo, não randomizado, em 18 pacientes portadoras de câncer de mama com axila clinicamente negativa em estágio T2=4cm, T3 e T4. As pacientes foram submetidas à injeção subareolar de um marcador autólogo rico em hemossiderina 48 horas antes do procedimento cirúrgico para biópsia do linfonodo sentinela, e sua taxa de identificação foi comparada, no intraoperatório, com o marcador radioativo Tc99 (padrão-ouro). A concordância entre os métodos foi estabelecida pelo índice de Kappa. **Resultados:** a taxa de identificação do linfonodo sentinela foi de 88,9%, com uma média de dois linfonodos sentinelas por paciente. O estudo identificou os linfonodos sentinelas corados com hemossiderina em 83,3% dos casos (n=15), quando comparados com a taxa de identificação do Tc99, tendo sido observada concordância em 94,4% dos casos estudados. **Conclusão:** o marcador autólogo rico em hemossiderina se mostrou eficaz na identificação do linfonodo sentinela em casos de câncer de mama localmente avançado.

Descritores: Neoplasias da Mama. Biópsia de Linfonodo Sentinela. Hemossiderina. Tecnécio.

INTRODUÇÃO

O linfonodo sentinela (LS) consiste no primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática de um determinado sítio de tumor primário¹. Cabanas¹, em 1977, em seus estudos utilizando casos de adenocarcinoma de pênis estabeleceu pela primeira vez uma técnica para realizar biópsia do linfonodo sentinela (BLS). Com o objetivo de aprimorar a taxa de identificação do LS em casos de melanoma, Krag *et al.*², em 1993, utilizou o Tecnécio 99 (Tc99) com sucesso. Posteriormente, em 1994, Giuliano *et al.*³ usando azul patente como marcador de LS para o câncer de mama, introduziu o conceito de BLS na prática clínica. Em 2003, Veronesi *et al.*⁴, estabeleceram que a BLS era um método seguro e acurado para avaliar metástases axilares em mulheres com tumores de mamas pequenos. Atualmente, a BLS substituiu o esvaziamento axilar no estadiamento do câncer de mama inicial, com axila clinicamente negativa⁵.

A associação do Tc99 em combinação com o corante azul mostrou-se mais acurada para identificação do BLS^{6,7}. Outros corantes podem ser utilizados na iden-

tificação do LS durante o procedimento cirúrgico, como o azul de metileno, o azul patente e o isosulfan⁸. Entretanto, tais substâncias, em revisão recente da literatura, revelaram um expressivo número de reações de hipersensibilidade^{9,10}. O azul patente pode causar desde efeitos adversos sutis, como rash cutâneo, até reações severas de anafilaxia^{11,12}. O azul de metileno também pode causar sérias reações, incluindo necrose de pele e gordura no local da injeção¹³. Reações anafiláticas com o isosulfan e azul patente em pacientes submetidas à BLS variam de 0,6% a 2,7%¹⁴.

Em 2009, Pinheiro *et al.*¹⁵ comprovou em pesquisa experimental em animais, a eficácia da hemossiderina, um produto da degradação da hemoglobina, proteína frequentemente encontrada nos lisossomos de histiócitos e de células de Kupfer, como corante autólogo na BLS em mama de cadelas. Nesse estudo, a associação de hemossiderina e Tc99, apresentou resultados semelhantes na BLS quando comparados ao Tc99 e azul patente. A hemossiderina apresentou-se, experimentalmente, como um novo corante, isento de efeitos adversos e uma alternativa aos corantes atuais.

1 - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, CE, Brasil. 2 - Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Fortaleza, CE, Brasil. 3 - SONIMAGEM, Diagnóstico por Imagem, Fortaleza, CE, Brasil. 4 - Universidade de Fortaleza, Faculdade de Medicina, Fortaleza, CE, Brasil. 5 - Universidade Federal do Ceará, Hospital Universitário Walter Cantídio, Fortaleza, CE, Brasil.

Em 2015, Vasques *et al.*¹⁶, introduziu os estudos da hemossiderina em casos de câncer de mama em humanos em tumores iniciais (T1/T2) com axila clinicamente negativa e obteve sucesso, com uma taxa de identificação e de concordância de 100% quando comparada ao padrão-ouro, o Tc99. Diante disso, por ter sido estudada apenas em tumores iniciais, a proposta desse trabalho foi avaliar a eficácia da utilização da hemossiderina como marcador autólogo para a identificação do linfonodo sentinela em cânceres de mama em pacientes portadoras de tumores localmente avançados (T2>4cm/T3/T4), comparando com o teste padrão-ouro, o Tc99.

MÉTODOS

Ensaio clínico fase 1, do tipo prospectivo, não randomizado, tendo como objeto mulheres portadoras de câncer de mama localmente avançado. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC) e Hospital Universitário Walter Cantídio, por um único cirurgião, no período de janeiro a dezembro de 2016. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, no 2.032.200. Cada paciente foi informada a cerca dos procedimentos e assinou um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação da pesquisa.

Amostra e critérios de seleção

A amostra foi constituída por 18 mulheres, não randomizadas, selecionadas no Ambulatório de Mastologia da Maternidade Escola Assis Chateaubriand (MEAC), com indicação de BLS. Foram incluídas pacientes com idades entre 18 e 75 anos, portadoras de câncer de mama com diagnóstico anatomopatológico comprovado, em estádios II (maior ou igual a 4cm), III e IV e que apresentavam axila clinicamente negativa antes da quimioterapia neoadjuvante. Foram excluídas as pacientes portadoras de câncer de mama inflamatório, gestantes, aquelas que tinham recebido algum ciclo de quimioterapia ou radioterapia neoadjuvante ou que realizaram cirurgia axilar e/ou biópsia incisional prévia, que pudesse comprometer a drenagem linfática da mama.

Uma semana antes do início do estudo, todas

as participantes foram submetidas à avaliação clínica e laboratorial pré-operatória estando as mesmas aptas à serem submetidas ao procedimento cirúrgico. O perfil do ferro também foi avaliado previamente por meio do hemograma completo, das dosagens de ferro sérico, ferritina sérica, saturação de transferrina e capacidade total de ligação do ferro.

Preparação do marcador rico em hemossiderina

O preparo da hemossiderina para utilização no estudo foi obtida a partir de uma amostra de 16ml de sangue periférico, 48 horas antes da cirurgia. O sangue coletado era acondicionado em dois tubos BD *Vacutainer*® de Citrato de Sódio Tamponado, de forma asséptica. Em seguida, era centrifugado a 2000rpm, a 22°C, por dez minutos. O material centrifugado se distribuiu em três camadas no tubo de ensaio. As camadas superior e intermediária (soro) eram descartadas, e a camada inferior (hemácias) diluída com soro fisiológico em igual volume ao retirado, e homogeneizado manualmente em câmara protegida por fluxo laminar. A solução obtida era novamente centrifugada (3800rpm por três minutos), com o aparecimento de duas fases. A primeira era descartada e o volume retirado repostado com água bidestilada, na câmara de fluxo laminar, provocando a hemólise do concentrado de hemácias. Após a terceira e última centrifugação (3800rpm por três minutos), obteve-se uma única fase de hemácias lisadas, um produto rico em hemossiderina em suspensão no líquido avermelhado. A garantia da esterilidade foi controlada com hemoculturas para bactérias e fungos.

Um volume de 4ml do corante rico em hemossiderina era injetado ambulatoriamente, com a paciente em decúbito dorsal, sob anestesia local com xilocaína a 2%, sem adrenalina, na região periareolar externa da mama (no sentido de 3h), em punção única e sob técnica asséptica (Figuras 1A e 1B).

As pacientes foram internadas e avaliadas quanto a apresentação de efeitos colaterais por 24 horas. Antes do procedimento cirúrgico, cada paciente foi submetida à injeção intradérmica subareolar pré-operatória de 0,2ml de Tc99 e, em seguida, sob anestesia local e sedação, foram submetidas ao procedimento cirúrgico.

Procedimentos: biópsia do linfonodo sentinela (BLS)

As pacientes foram submetidas à BLS, com incisão na prega axilar guiada pelo gama-probe, dissecação por planos até a identificação de ponto de captação máxima do Tc99, identificando-se o linfonodo marcado e a sua coloração (Figuras 2A e 2B). Após a exérese do linfonodo, verificou-se em cada um a intensidade de detecção do Tc99 pelo gama-probe. Tais dados foram registrados em uma ficha de coleta de dados para fins de análise posterior. Todas as peças cirúrgicas foram encaminhadas para estudo anatomopatológico e imunoistoquímico. As pacientes foram acompanhadas durante todo o procedimento, desde a injeção da hemossiderina, até o pós-operatório e retorno com 15 e 30 dias após a cirurgia.



Figura 1. A) Injeção subareolar de hemossiderina; B) Local pós-injeção da hemossiderina (hematoma pós-injeção).

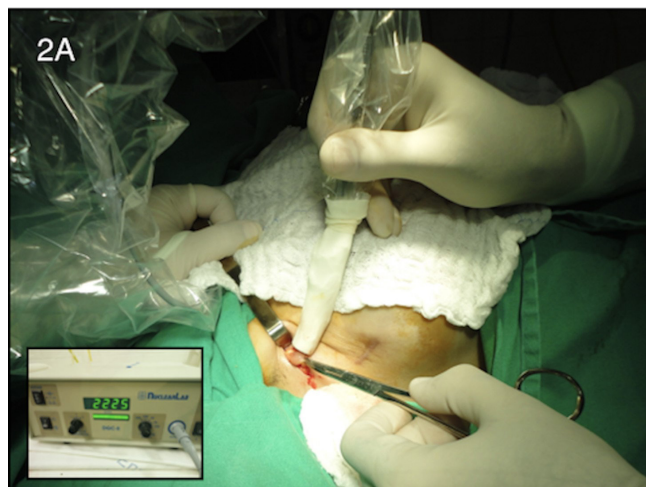


Figura 2. A) Identificação intraoperatória do linfonodo sentinela com o Gama-Probe; B) Linfonodos sentinelas fortemente marcados com hemossiderina.

Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando o coeficiente de concordância de Kappa. Valores do P foram determinados usando teste exato de Fisher. Valores de P menores e iguais a 0,05 foram aceitos como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Dezoito pacientes se submeteram à BLS com a hemossiderina de acordo com o método descrito. A média de idade das pacientes foi de 48,2 anos e observou-se que o *status* pré-menopausal predominou em 63,7% da amostra. Quanto ao tipo histológico, todas as pacientes estudadas possuíam carcinoma invasor,

sendo 17 do tipo ductal. Os tumores de estadiamento T3 predominaram na amostra e 55% das participantes apresentaram axila positiva após estudo histopatológico (Tabela 1). Não foram evidenciados efeitos adversos e/ou reações alérgicas, infecção cirúrgica ou toxicidade nas pacientes que foram submetidas à BLS com hemossiderina neste estudo.

No intraoperatório, a marcação com o preparado rico em hemossiderina se mostrou nitidamente satisfatória para a identificação visual e consequente diferenciação do LS dos demais linfonodos da cadeia axilar (Figura 3).

Tabela 1. Perfil clínico das pacientes incluídas no estudo e perfil anatomopatológico dos tumores analisados.

Características	Valor
Idade (média em anos)	48,2 (33-69 ± 11)
Status menopausal	
Pré-menopausa	n=12 (66,7%)
Pós-menopausa	7 (33,3%)
Grau de invasão	
Carcinoma invasor	18 (100%)
Carcinoma <i>in situ</i>	0 (0%)
Localização do tumor primário	
Quadrante superior externo	11(60,5%)
Quadrante superior interno	3 (16,5%)
Quadrante inferior externo	2 (11,1%)
Quadrante inferior interno	1 (5,5%)
Central	1 (5,5%)
Tamanho do tumor	
T2=4cm	
T3	1(5,4%)
14(77,8%)	
T4C	3 (16,6%)
Status linfonodal	
Linfonodo sentinela negativo	10 (55,5%)
Linfonodo sentinela positivo	8 (44,5%)
Subtipo Histológico	
Ductal	17 (94,5%)
Lobular	1 (5,5%)

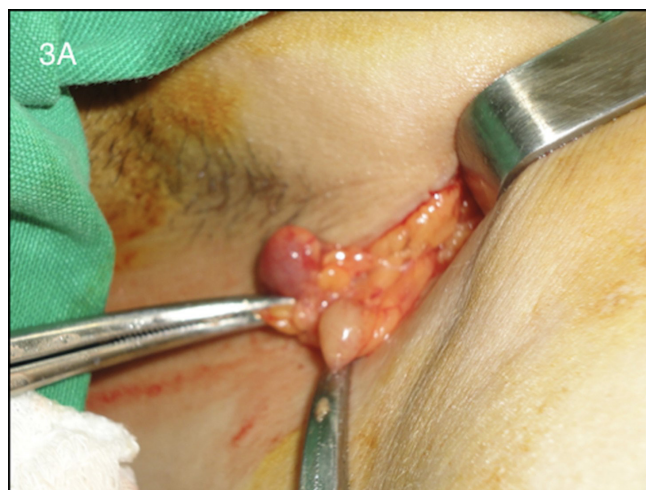


Figura 3. A) LS macroscopicamente corado pelo preparado rico em hemossiderina ao lado de outro linfonodo da cadeia axilar não corado; B) Aspecto intraoperatório do LS fortemente corado.

A eficácia da BLS com hemossiderina foi comparada à técnica padrão-ouro que utiliza a marcação com o Tc99, tendo-se observado uma detecção satisfatória do LS corado com hemossiderina e Tc99. A taxa de identificação do LS foi de 88,9%, sendo encontrado uma média de dois LS por paciente. O estudo identificou os LS corados com hemossiderina em 83,3% dos casos (n=15) e, quando comparado com a taxa de identificação do Tc99, foi observada uma concordância em 94,4% dos casos estudados, com índice de Kappa =0,77 e p=0,001 (Figura 4).

DISCUSSÃO

Estudos na literatura médica nas mais diversas condições mostram concordância aceitável no que diz res-

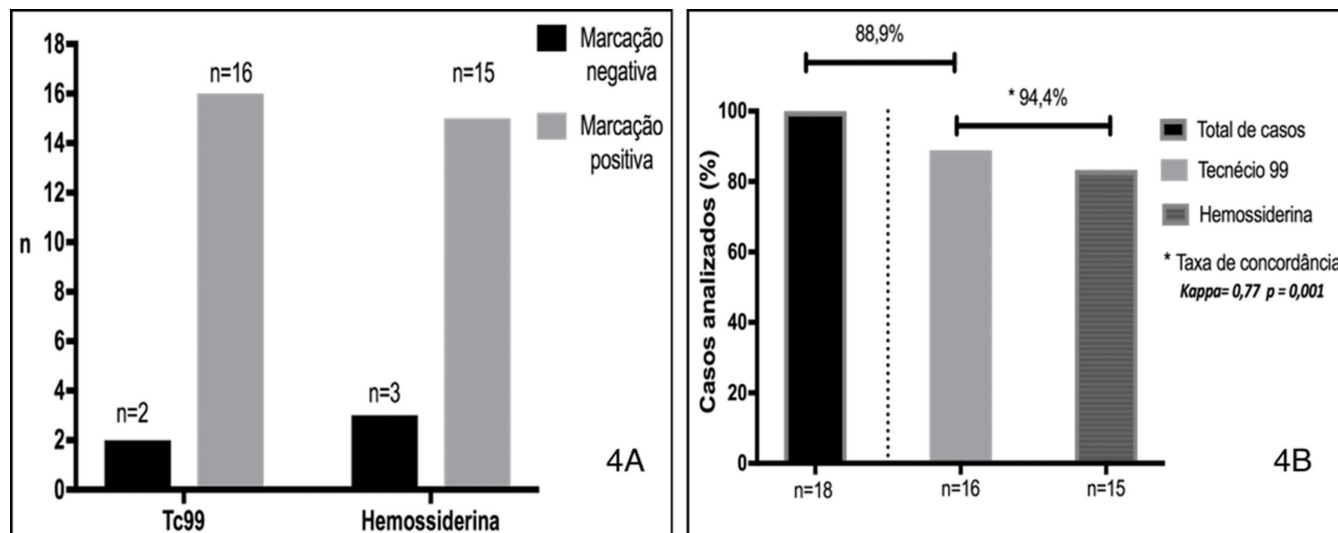


Figura 4. A) LS corados com hemossiderina e Tc99 por paciente; B) Taxa de concordância entre hemossiderina e Tc99 com significância estatística.

peito aos resultados encontrados no nosso trabalho. No estudo de Krag *et al.*², analisou-se 443 pacientes e a taxa de identificação foi de 93%. Albertini *et al.*¹⁷ associou as duas técnicas (azul patente e radiocoloide) e observou um aumento da taxa de identificação do LS, proporcionando taxa de identificação de 92% com valor preditivo de 100%. Já Veronesi *et al.*⁴ obtiveram taxa de identificação de 98,2% com falso negativo de 2,5%. Possíveis falhas na taxa de identificação podem ser justificadas por fatores inerentes à técnica, ao médico e ao paciente.

Quando se estuda pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante e em seguida submetidas à BLS, a taxa de identificação pode diminuir por fatores determinados pelos efeitos da quimioterapia. Estudo de Breslin *et al.*¹⁸ encontrou taxa de identificação de 84%. Outros ensaios proporcionaram taxas de identificação que variavam de 85 a 98%, como citado no trabalho de Xing *et al.*¹⁹. Jones *et al.*²⁰ compararam a biópsia do LS antes e depois da quimioterapia neoadjuvante encontrando taxa de identificação de 100% e 80,6%, respectivamente, e taxa de falso negativo elevada no grupo pós quimioterapia (11%). Na série estudada por Cox *et al.*²¹ de 89 pacientes com câncer de mama localmente avançado, estratificadas em dois grupos (axila positiva e axila negativa), evidenciou-se que a biópsia do LS pré-quimioterapia proporcionou acurácia adequada para axila negativa. Estudo de Papa *et al.*²² em que foram comparadas a biópsia do linfonodo sentinela pré e pós-quimioterapia, a taxa de identificação foi de 98,8% e 87%, respectivamente.

Outros marcadores para LS têm sido pesquisados e a nanopartícula férrica supermagnética resultou em taxa de identificação 77%, achados inferiores quando comparados com a utilização de hemossiderina como marcador autólogo em 14 pacientes submetidas à BLS, em que se obteve taxa de identificação de 100% com taxa de concordância de 100%¹⁶. Na nossa amostra, composta por 18 pacientes, houve identificação do LS em 16, quando utilizado o radiocoloide, e em 15 pacientes submetidas à técnica da hemossiderina, com uma taxa de concordância de 94,4% entre os dois métodos. A discrepância entre os dois métodos ocorreu em apenas uma paciente, em que se identificou o linfonodo pelo radiofármaco e não pela hemossiderina. Discute-se como causas prováveis, o tamanho da molécula de hemossiderina, uma vez que moléculas maiores podem não entrar nos ductos linfáticos, e a incapacidade de migração para o linfonodo estudado.

Existe uma tendência de se evitar o uso do radioisótopo e a exposição dos pacientes à radiação, assim como as complicações potencialmente graves do azul patente. Em unidades com departamentos de medicina nuclear estabelecidos, os custos são elevados, principalmente do gama-probe, e a meia-vida do radiofármaco é curta. O marcador autólogo estudado na amostra foi administrado com segurança 48 horas antes da cirurgia, sem efeitos adversos.

Nosso estudo sugere que seja viável a aplicabilidade clínica da hemossiderina como marcador autólogo na identificação do linfonodo sentinela em casos de câncer de mama localmente avançado.

ABSTRACT

Objective: to verify the agreement rate in the identification of sentinel lymph node using an autologous marker rich in hemosiderin and ⁹⁹Tc in patients with locally advanced breast cancer. **Methods:** clinical trial phase 1, prospective, non-randomized, of 18 patients with breast cancer and clinically negative axilla stages T2=4cm, T3 and T4. Patients were submitted to sub-areolar injection of hemosiderin 48 hours prior to sentinel biopsy surgery, and the identification rate was compared at intraoperative period to the gold standard marker ⁹⁹Tc. Agreement between methods was determined by Kappa index. **Results:** identification rate of sentinel lymph node was 88.9%, with a medium of two sentinel lymph nodes per patients. The study identified sentinel lymph nodes stained by hemosiderin in 83.3% patients (n=15), and, compared to ⁹⁹Tc identification, the agreement rate was 94.4%. **Conclusion:** autologous marker rich in hemosiderin was effective to identify sentinel lymph nodes in locally advanced breast cancer patients.

Keywords: Breast Neoplasms. Sentinel Lymph Node Biopsy. Hemosiderin. Technetium.

REFERÊNCIAS

- Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*. 1977;39(2):456-66.
- Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol*. 1993;2(6):335-9; discussion 340.
- Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg*. 1994;220(3):391-8; discussion 398-401.
- Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrada S, Galimberti V, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003;349(6):546-53.
- Lyman GH, Temin S, Edge SB, Newman LA, Turner RR, Weaver DL, Benson AB 3rd, Bosserman LD, Burstein HJ, Cody H 3rd, Hayman J, Perkins CL, Podoloff DA, Giuliano AE; American Society of Clinical Oncology Clinical Practice. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2014;32(13):1365-83.
- Rutgers EJ. Guidelines to assure quality in breast cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2005;31(6):568-76.
- Straver ME, Meijnen P, van Tienhoven G, van de Velde CJ, Mansel RE, Bogaerts J, et al. Sentinel node identification rate and nodal involvement in the EORTC 10981-22023 AMAROS trial. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(7):1854-61.
- Thill M, Kurylcio A, Welter R, van Haasteren V, Grosse B, Berclaz G, et al. The Central-European SentiMag study: sentinel lymph node biopsy with superparamagnetic iron oxide (SPIO) vs. radioisotope. *Breast*. 2014;23(2):175-9.
- Kalimo K, Jansén CT, Korman M. Sensitivity to Patent Blue dye during skin-prick testing and lymphography. A retrospective and prospective study. *Radiology*. 1981;141(2):365-7.
- Mertes PM, Malinovsky JM, Mouton-Faivre C, Bonnet-Boyer MC, Benhaijoub A, Lavaud F, et al. Anaphylaxis to dyes during the perioperative period: reports of 14 clinical cases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;122(2):348-52.
- Haque RA, Wagner A, Whisken JA, Nasser SM, Ewan PW. Anaphylaxis to patent blue V: a case series and proposed diagnostic protocol. *Allergy*. 2010;65(3):396-400.
- Wöhrl S, Focke M, Hinterhuber G, Stingl G, Binder M. Near-fatal anaphylaxis to patent blue V. *Br J Dermatol*. 2004;150(5):1037-8.
- Salhab M, Al Sarakbi W, Mokbel K. Skin and fat necrosis of the breast following methylene blue dye injection for sentinel node biopsy in a patient with breast cancer. *Int Semin Surg Oncol*. 2005;2:26.
- Scherer K, Studer W, Figueiredo V, Bircher AJ. Anaphylaxis to isosulfan blue and cross-reactivity to patent blue V: case report and review of the nomenclature of vital blue dyes. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2006;96(3):497-500.
- Pinheiro LG, Oliveira Filho RS, Vasques PH, Filgueira PH, Aragão DH, Barbosa PM, et al. Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. *Acta Cir Bras*. 2009;24(6):432-6.
- Vasques PH, Alves MM, Aquino RG, Torres RV, Bezerra JL, Brasileiro LP, et al. Comparison between hemosiderin and Technetium-99 in sentinel lymph

- node biopsy in human breast cancer. *Acta Cir Bras.* 2015;30(11):785-90.
17. Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, Yeatman T, Balducci L, Ku N, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA.* 1996;276(22):1818-22.
 18. Breslin TM, Cohen L, Sahin A, Fleming JB, Kuerer HM, Newman LA, et al. Sentinel lymph node biopsy is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18(20):3480-6.
 19. Xing Y, Cormier JN, Kuerer HM, Hunt KK. Sentinel lymph node biopsy following neoadjuvant chemotherapy: review of the literature and recommendations for use in patient management. *Asian J Surg.* 2004;27(4):262-7.
 20. Jones JL, Zabicki K, Christian RL, Gadd MA, Hughes KS, Lesnikoski BA, et al. A comparison of sentinel node biopsy before and after neoadjuvant chemotherapy: timing is important. *Am J Surg.* 2005;190(4):517-20.
 21. Cox CE, Cox JM, White LB, Stowell NG, Clark JD, Allred N, et al. Sentinel node biopsy before neoadjuvant chemotherapy for determining axillary status and treatment prognosis in locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2006;13(4):483-90.
 22. Papa MZ, Zippel D, Kaufman B, Shimon-Paluch S, Yosepovich A, Oberman B, et al. Timing of sentinel lymph node biopsy in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Surg Oncol.* 2008;98(6):403-6.
- Recebido em: 16/08/2017
Aceito para publicação em: 17/09/2017
Conflito de interesse: nenhum.
Fonte de financiamento: nenhuma.
- Endereço para correspondência:**
Luiz Gonzaga Porto Pinheiro
E-mail: luizgporto@uol.com.br