

Distribuição do dextran-^{99m}Tc e do carvão ativado no linfonodo-sentinela em coelho

Distribution of dextran-^{99m}Tc and activated carbon in sentinel lymph nodes of rabbits

ROGÉRIO PORTO DA ROCHA¹
ELKE LUSMÖLLER PORTO DA ROCHA²
LEDA VIEGAS DE CARVALHO³
EWALDO BOLIVAR DE SOUZA PINTO⁴
RODRIGO P. M. DE SOUZA⁵

RESUMO

Objetivos: Avaliar a viabilidade do carvão ativado (CA) como marcador intra-operatório para detecção do linfonodo sentinela (LS) e sua distribuição em comparação com o dextran-^{99m}Tc.

Métodos: Realizou-se a injeção intradérmica de dextran-^{99m}Tc e de uma solução contendo CA e azul patente V na proporção de 1:1 em 16 coelhos da raça Nova Zelândia de sexo, peso e idade semelhantes. O LS foi identificado e ressecado. Aferiu-se a sua radioatividade e, em seguida, foi submetido a exame histológico convencional para quantificação e determinação da distribuição do CA.

Resultados: Durante a dissecação foi possível observar, em todos os casos, a impregnação do corante azul patente V no LS. A leitura da radioatividade em i/s e as medidas, em cruces, da quantidade de CA obtidas no LS, permitiram dividi-lo em duas metades, sendo uma hiper (H1) e a outra hipocaptante (H2).

Conclusões: A solução de CA (6%) e corante vital (azul patente V) na proporção 1:1 determinou uma fácil identificação do LS no intra-operatório. A análise comparativa da distribuição do CA e do

ABSTRACT

Aims: To determine the distribution of dextran-^{99m}Tc in the sentinel lymph node (SLN), and whether activated carbon tends to concentrate more on one side of the SLN and thus could be utilized as an intraoperative marker.

Methods: Sixteen rabbits of New Zealand breed were utilized, with ages ranging from three to six months. They underwent administration of 0.1 ml of dextran-^{99m}Tc on the plantar face of the right hind paw, 20 minutes prior to SLN biopsy. One ml of a solution containing 3% activated carbon and patent blue V in the proportions 1:1 was then injected close to the dextran-^{99m}Tc injection site. Twenty minutes later, the radioactivity was measured at the injection site and at the popliteal fossa to confirm the time taken for dextran-^{99m}Tc to migrate, and for subsequent comparison with the SLN radioactivity levels. The lymph node identified was resected and the points of greatest (H1) and least (H2) radioactivity uptake were measured.

Results: Formation of two papules derived from the injections of dextran-^{99m}Tc and patent blue V plus activated carbon was observed, thus proving the occurrence of effective lymphatic circulation during the period between application of the dye and SLN dissection. The mean

¹ Cirurgião Plástico, Professor do UNILUS, Santos, SP.

² Médica Especialista pela Sociedade Brasileira de Dermatologia.

³ Patologista e Professora do UNILUS, Santos, SP.

⁴ Cirurgião Plástico, Chefe do Centro Científico Brasileiro de Cirurgia Plástica, Santos.

⁵ Médico Residente do Serviço de Cirurgia Plástica da Universidade Santa Cecília.

dextran-^{99m}Tc demonstra que ambos se comportaram da mesma forma concentrando-se na mesma metade do LS.

DESCRIPTORIOS: SULFATO DE DEXTRANA; CARVÃO ATIVADO; LINFONODO-SENTINELA; COELHOS.

uptakes in the H1 and H2 halves of the SLN were 6139 I/s and 4549 I/s, respectively.

Conclusions: Analysis of the radioactivity in the resected SLN suggested that greater dextran-^{99m}Tc uptake occurred in just one of its halves. Activated carbon can be utilized as an intraoperative method for identifying the SLN.

KEY WORDS: SENTINEL LYMPH NODE, RABBIT, CARBON DYE, DEXTRAN, TECNECIUM.

INTRODUÇÃO

O Linfonodo-Sentinela (LS) representa aquele que, contido em um grupo regional, primeiro drena a linfa proveniente de um tumor sólido. A pesquisa e a prevenção de micrometástases (Mm) tem sido um importante instrumento na erradicação a doença tumoral, evitando-se as linfadenectomias extensas. Entende-se por micrometástases, em patologia, como a área focal de até 2 mm, com células neoplásicas agrupadas.¹

A biópsia de linfonodo sentinela (BLS) surgiu no final do século XX como um procedimento para detectar Mm em linfonodos da cadeia de drenagem linfática, substituindo as linfadenectomias eletivas. O procedimento de BLS compreende três etapas fundamentais: a) linfocintilografia pré-operatória (LSPO); b) BLS propriamente dita (utilizando mapeamento linfático com corante vital e detecção gama intra-operatória); e c) exame histopatológico do LS.^{2,3}

A LSPO identifica as bases linfonodais de risco para doença metastática onde deve ser feita a pesquisa do LS, notadamente para os tumores de drenagem ambígua. O isótopo mais utilizado é a forma metaestável do tecnécio (^{99m}Tc).⁴

O LS é localizado com um detector portátil de radiação gama intra-operatória, o que permite uma dissecação menos agressiva e complementa o mapeamento linfático com corante vital.^{5,6}

O LS é submetido a exame histopatológico convencional (HE) e a estudo imunohistoquímico pesquisando-se marcadores de células tumorais. No entanto, não foram encontrados na literatura estudos avaliando a distribuição dos diferentes radiofármacos bem como outras substâncias no LS.

Uma questão relevante a ser considerada seria se o carvão ativado (CA) teria o mesmo comportamento que o dextran-^{99m}Tc ao chegar ao LS.

Além disto, não se sabe se ambos poderiam simular o trajeto de uma Mm de melanoma cutâneo. Atualmente, utiliza-se um radiofármaco para a detecção de radiação no LS. É interessante determinar se o uso do CA poderia ser um coadjuvante nessa detecção. Baseado nestas questões, o presente estudo procurou determinar se: a migração do dextran-^{99m}Tc ocorre para uma mesma região do LS; se o CA tende a se concentrar mais em um dos lados do LS; se a distribuição do CA corresponde àquela observada pelo dextran-^{99m}Tc; e se o CA pode ser utilizado como um marcador intra-operatório para a detecção do LS.

MÉTODO

O projeto desse estudo foi submetido ao Comitê de Ética e o Núcleo de Radioproteção da Universidade Federal de São Paulo, tendo sido aprovado em ambos.

Foram utilizados 16 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, adultos com peso entre 2,6 e 3,0 kg, com idade variando entre 3 e 6 meses.

Os experimentos foram realizados no mês de maio de 2003, durante duas semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais (40 cm × 20 cm × 25 cm) sendo observados quanto às suas condições de saúde, por quatro dias após sua chegada ao biotério. Todos os coelhos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura (19°C) e umidade ambiental e foram isolados acusticamente. Receberam ração comercial (Purina - 150g/dia/animal), água *ad libitum* e iluminação artificial com lâmpada de 100 W com fotofase de 12 horas. Os animais foram identificados por uma ficha contendo todos os dados pertinentes. Cada animal foi anestesiado com 0,4 ml de uma solução composta de cetamina (35 mg/kg) e xilazina (05 mg/kg) na proporção de 1:1, com seringa de 10 ml e agulha 30 × 7, injetado na coxa esquerda por via intramuscular.

Procedeu-se à exposição da pele da região poplíteia através da depilação manual (Figura 3).

O radiofármaco utilizado foi o dextran 500, um polissacarídeo de alto peso molecular, cujo diâmetro é de 20 nm.^{4,7,8} A administração de 0,1 ml do dextran-^{99m}Tc (correspondendo a 0,1 mCi do ^{99m}Tc) foi realizada vinte minutos antes do procedimento de BLS. A injeção foi aplicada na face plantar da pata traseira direita de cada animal, distalmente à injeção da solução contendo CA e azul patente V que seria aplicada posteriormente.

Cinco minutos após a injeção de dextran-^{99m}Tc e, portanto, 15 minutos antes do procedimento de BLS, injetou-se 1,0 ml de uma solução contendo CA (*Indian Ink* - TalensTM) a 3% e azul patente V na proporção de 1:1 num sítio proximal na pata dos animais para evitar a obstrução de casos linfáticos o que impediria o trânsito do dextran-^{99m}Tc (Figura 4). O corante azul patente V foi utilizado apenas como meio facilitador da localização do LS. Vinte minutos após a injeção do radiofármaco aferiu-se a radioatividade do leito de injeção e da fossa poplíteia com um aparelho de detecção gama intra-operatório (Neoprobe 2000) (Figura 5) para confirmação do tempo de migração do radiofármaco (confirmando os 20 minutos) e posterior comparação aos níveis de radioatividade no LS. Após estas medidas, realizou-se uma incisão longitudinal e transversal com bisturi (lâmina 23) sobre a pele da região poplíteia direita do animal, a fim de localizar o LS (Figuras 6-9).

Considerou-se o linfonodo como LS quando este se apresentava azul e/ou quando a contagem da radioatividade era 5 vezes maior do que a contagem de fundo *in vivo* ou 10 vezes mais *ex-vivo*.

Após a ressecção do LS identificado foram aferidos o ponto de maior e o de menor radioatividade com o detector gama em contato com a sua superfície. O LS foi, então, dividido em duas metades: uma com o ponto de maior captação (H1) e outra com o de menor captação (H2) (Figura 9).

Após as medidas, o LS foi submetido à fixação em formaldeído a 10% e enviado à análise histológica usual. Durante o processo de análise histológica dos espécimes, as siglas referentes ao resultado da análise da captação do radiofármaco (H1 e H2) não foram identificadas para que o resultado não sofresse qualquer tipo de influência.

Os espécimes foram, então, inseridos em blocos de parafina, identificados separadamente por letras e seccionados em fatias seriadas de 1 a 2 µm de espessura. Caso alguma das lâminas H1 ou H2 não apresentasse o CA, novos cortes com espessura semelhante seriam realizados sobre o bloco de parafina (em um total de 5 cortes) a fim de descartar falso-negativos. Os espécimes foram submetidos a exame histológico convencional (coloração pela HE) para a quantificação e a determinação da distribuição do CA em cada metade do LS.

Foram criadas tabelas com os dados colhidos no intra-operatório (hiper e hipocaptante) e com os dados do exame anátomo-patológico (presença ou ausência de CA e maior ou menor concentração do CA).

Utilizou-se, para análise estatística, os testes de correlação de Spearman e de correlação linear.

RESULTADOS

A injeção do dextran-^{99m}Tc e do CA determinaram a formação de uma pápula proximal e distal, respectivamente na pata de cada animal. Estas pápulas demonstram que as substâncias administradas foram drenadas por vasos linfáticos localizados na espessura da derme, simulando, portanto, a mesma drenagem linfática dos tumores de pele.

Foi observado o LS poplíteo através da coloração azulada e com pontos enegrecidos, devida à presença do corante azul patente V e do CA, demonstrando que houve circulação linfática efetiva durante o período decorrente desde a aplicação do corante até a dissecação do LS (Figuras 7 e 8).

Os dados referentes ao animal 10 foram desconsiderados para efeito de cálculo, pois ele foi à óbito durante o procedimento anestésico.

Notou-se que o valor médio da captação máxima foi de 43365 i/s no sítio de injeção, enquanto que na fossa poplíteia foi de 3254 i/s. Já a média derivada das medidas realizadas no LS apresentou valor superior, 6890 i/s, que supera o dobro da média obtida na fossa poplíteia (Tabela 1). Todos os animais obedeceram a este padrão médio de radioatividade, exceto o coelho 11 que apresentou uma leitura máxima com valores decrescentes do sítio de injeção (46100 i/s) ao LS (3500 i/s). Isso pode ter ocorrido devido a uma variação anatômica na drenagem linfática naque-

la região ou pela injeção de parte do material radioativo na camada subdérmica da pata do animal, o que levaria o material radioativo a atingir vasos linfáticos de drenagem para outra região que não a poplítea.

O menor valor da leitura máxima aferido no sítio de injeção foi de 16.680 i/s e o maior valor, de 80000 i/s. Na fossa poplítea, o menor valor de captação máxima aferido foi de 877 i/s e o maior foi de 8062 i/s (Tabela 1).

Com o detector gama posicionado sobre a superfície do LS, a metade com maior captação foi separada da outra com menor captação por meio de uma lâmina de bisturi. Assim, o corte com bisturi foi realizado longitudinal ou transversalmente ao maior eixo do linfonodo, sendo que a região do hilo, em 6 casos foi transeccionada. Em outros 7 casos, ela foi seccionada longitudinalmente. Nos 2 casos restantes, o hilo não foi atingido pelo corte.

A fim de demonstrar a quantidade de CA, considerou-se o seguinte critério: Ø quando o CA não estava presente; uma cruz (+) quando havia pequena concentração do CA; duas cruces (++) para uma concentração moderada; três cruces (+++) quando foi observada uma elevada concentração; e nos casos de concentrações muito elevadas, quatro cruces (++++) foram utilizadas (Figuras 11-15).

Os valores de maior e de menor captação no LS, não obedeceram a um padrão pré-estabelecido nas metades H1 e H2. A média de captação da metade H1 do LS foi de 6139 i/s e a da metade H2, foi de 4549 i/s. A metade H1 apresentou captação da radioatividade 25% maior que na metade H2. O menor valor de captação na metade H1 foi de 1658 i/s e o maior valor, 12559 i/s. Na metade H2, o menor valor de captação foi de 972 i/s e o maior valor, 10600 i/s. Não foi observado um predomínio da distribuição do CA em uma das duas metades referidas como H1 e H2, após a análise qualitativa em cruces (Tabela 2).

A distribuição do CA no vaso aferente e, principalmente, no seio subcapsular foi observada na maioria dos casos (12 coelhos - 75%); em apenas dois deles, a distribuição do CA ocorreu também na região medular em uma das metades estudadas (H1 ou H2). Em 4 casos (25%) não se observou o CA no LS.

A correlação de Spearman apresentou um coeficiente de coeficiência ($r = 0,8001$) (Figura 16) e no segundo caso o coeficiente foi de $r = 0,9367$ (Figura 17). A diferença entre os coeficientes é de

0,1366, ou seja, é baixa, podendo-se dizer que a leitura do CA nas metades H1 e a H2 obteve a mesma característica da leitura da radioatividade nas metades H1 e H2.

TABELA 1 - Peso dos animais em gramas (g) e as leituras da radioatividade em impulsos por segundo (i/s), derivadas do Dextran-^{99m}Tc, realizadas no sítio da injeção, na fossa poplítea e no linfonodo-sentinela.

Animal	Peso (g)	Leitura máxima sítio da injeção (i/s)	Leitura máxima na fossa poplítea (i/s)	Leitura no linfonodo-sentinela (LS) (i/s)
1	2750	48.000	3800	5900
2	2800	53.000	1920	4500
3	2930	80.000	1730	4035
4	2670	16.680	2430	6700
5	3010	41.398	4072	9130
6	2970	63.358	877	6432
7	2890	47.093	3614	11081
8	2690	58.416	2875	17415
9	2660	60.809	4370	4000
10	2880	-/-	-	-
11	2987	46.100	4580	3500
12	2700	31.460	2354	5565
13	2780	26.176	1406	2317
14	2700	20.171	3337	7314
15	2800	36.569	8062	10930
16	2800	21.249	3385	4534
Média	2813,56	43365,27	3254,13	6890,20

TABELA 2 - Medidas de peso dos animais (g), das leituras de radioatividade em i/s e medidas em cruces da quantidade de Carvão Ativado obtidas no linfonodo-sentinela e nas metades hipercaptante (H1) e hipocaptante (H2).

Animal	Leitura no linfonodo-sentinela (LS) (i/s)	Leitura na metade hipercaptante (H1) (i/s)	Leitura na metade hipocaptante (H2) (i/s)	Carvão ativado na metade H1	Carvão ativado na metade H2
1	5900	4200	3100	+++	+++
2	4500	12100	9600	+	++
3	4035	4850	3410	Ø	Ø
4	6700	9340	7680	++++	+++
5	9130	5600	3500	+	++
6	6432	5638	3971	+	+
7	11081	7085	7000	Ø	Ø
8	17415	11900	10600	+++	+++
9	4000	2299	1241	+++	++
10	-	-	-	-	-
11	3500	2371	1932	++	+++
12	5565	3136	1600	Ø	Ø
13	2317	1658	972	+	+
14	7314	6339	5709	+	++
15	10930	12559	6670	++	+
16	4534	3021	1250	++	+
Média	6890,20	6139,73	4549,00		

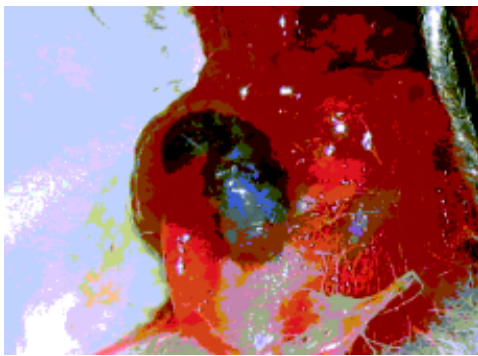


Figura 1

Linfonodo-Sentinela poplíteo dissecado e sua coloração azulada e com pontos enegrecidos mostrando a presença do corante azul patente V e do Carvão Ativado.

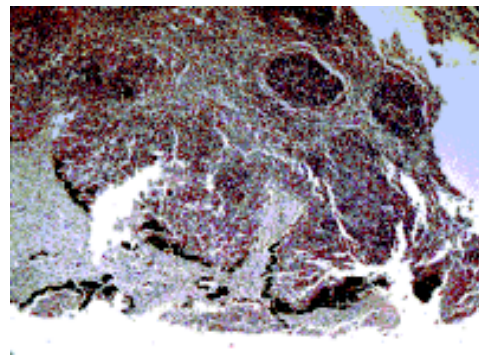


Figura 5

O seio subcapsular do Linfonodo-Sentinela apresenta Carvão Ativado em elevada concentração (+++/++++).

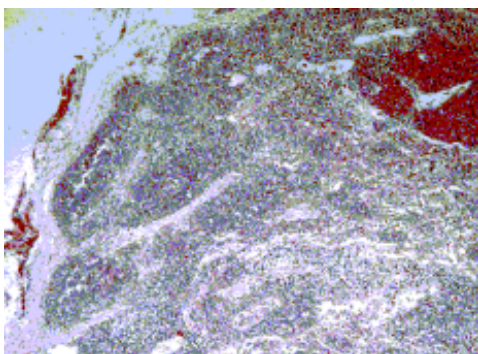


Figura 2

Linfonodo Sentinela da fossa poplíteia de coelho onde se nota a ausência de Carvão Ativado.

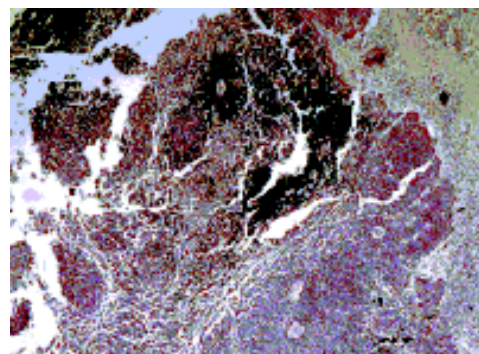


Figura 6

O Carvão Ativado, na figura, dispõe-se no seio subcapsular e na medula do Linfonodo Sentinela em muito elevada concentração (++++/++++).

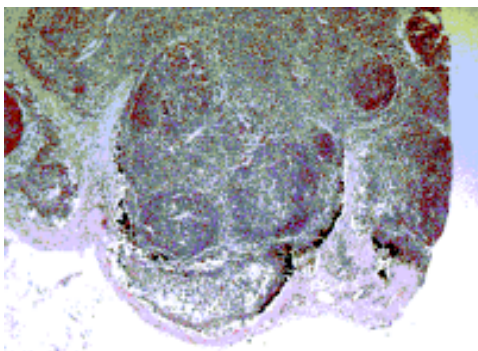


Figura 3

Mostra de uma pequena concentração de Carvão Ativado no Linfonodo Sentinela (classificado como +/-++++).

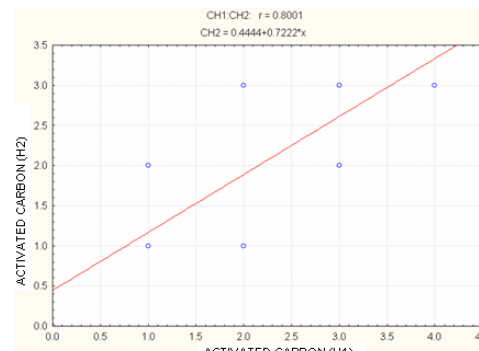


Figura 7

Correlação de Spearman R para os valores de H1 e H2 do Linfonodo Sentinela.

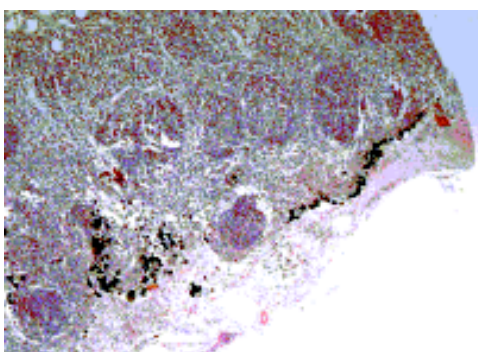


Figura 4

O Carvão Ativado observado no seio subcapsular do Linfonodo-Sentinela apresenta moderada concentração (++/++++).

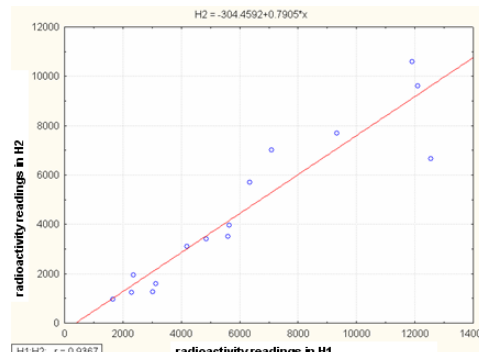


Figura 8

Correlação Linear para a leitura nas metades H1 e H2 do Linfonodo Sentinela.

CONCLUSÕES

Mediante os resultados encontrados, pudemos concluir que:

1. Foi possível evidenciar, no presente estudo, que a utilização do dextran-^{99m}Tc apresentou grande eficiência, uma vez que a sua presença foi evidenciada pelo detector gamma-probe em todos os casos 20 minutos após a injeção do radiofármaco.
2. O carvão ativado pode ser utilizado como um método de identificação do linfonodo sentinela no intra-operatório, uma vez que suas partículas, maiores que as do dextran-^{99m}Tc, permanecem por um maior período de tempo nos linfonodos e isto pôde ser observado na maioria dos casos.
3. O tempo necessário para a injeção intradérmica do carvão ativado em coelho é de 15 minutos para a sua detecção histológica em linfonodo-sentinela poplíteo;
4. A análise da radioatividade do linfonodo-sentinela ressecado sugere que a maior captação do dextran-^{99m}Tc ocorre em apenas uma de suas metades.
5. A solução de carvão ativado (6%) e corante vital (azul patente V) na proporção 1:1 determinou uma fácil identificação do linfonodo-sentinela no intra-operatório.
6. A análise comparativa da distribuição do carvão ativado e do dextran-^{99m}Tc demonstra que ambos se comportaram da mesma forma, concentrando-se na mesma metade do linfonodo-sentinela. Assim, acreditamos que a identificação de partículas de carvão ativado em uma área do seio subcapsular e paratrabecular do linfonodo-sentinela pode alertar o patologista para o encontro de micrometástases na mesma área.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira-Filho RS, Rezende G, Wagner J. Biópsia de linfonodo sentinela no melanoma cutâneo. In: Oliveira-Filho RS, organizador. Melanoma cutâneo localizado e linfonodo sentinela. São Paulo: LEMAR; 2003. v. 1, p. 113-24.
2. Morton DL, Thompson JF, Esser R. et al. Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and

sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma. Arch Surg. 1992;230:453-65.

3. Morton DL, Wen DR, Wong JH, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg. 1992;127:392-9.
4. Neubauer S, Mena I, Iglesias R, et al. Sentinel lymph node mapping in melanoma with technetium-^{99m} dextran. Cancer Biother Radiopharm. 2001;16:265-7.
5. Pijpers R, Borgstein PJ, Meijer S, et al. Sentinel biopsy in melanoma patients: dynamic lymphoscintigraphy followed by intraoperative gamma probe and vital dye guidance. World J Surg. 1997;21:788-93.
6. Woyfnorth HB, Flecknell P. Specific surgical operations. In: Experimental and surgical techniques in the rat. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1992. p.203-312.
7. Oliveira Filho RS, Santos ID, Ferreira LM, et al. Is intraoperative gamma probe detection really necessary for inguinal sentinel lymph node biopsy? São Paulo Med J. 2000;118:165-8.
8. Oliveira-Filho RS, Ferreira LM, Barbieri A, et al. Linfadenectomia seletiva com biópsia de linfonodo sentinela no melanoma cutâneo: experiência brasileira - Projeto FAPESP 97/02516-0. An Bras Dermatol. 2000; 75:573-80.
9. Haigh PI, Lucci A, Turner RR, et al. Carbon dye histologically confirms the identity of sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma. Cancer. 2001;92:535-41.
10. Glass EC, Essner R, Morton DL. Kinetics of three lymphoscintigraphic agents in patients with cutaneous melanoma. J Nucl Med. 1998;39:1185-90.
11. Ludwig J. Ueber Kurschlusswege der lymphbahnen und ihre Beziehungen zur lymphogen krebsmetastasierung. Pathol Microbiol. 1962;25:329-34.
12. Taniguchi I, Sakurada A, Murakami G, et al. Comparative histology of lymph nodes from aged animals and humans with special reference to the proportional areas of the nodal cortex and sinus. Ann Anat. 2004; 186:337-47.
13. Rópolo A, Morón VG, Maletto B, et al. Diminished percentage of antigen bearing cells in the lymph nodes of immune aged rats. Exp Gerontol. 2001;36:519-35.
14. Hoshi H, Horie K, Tanaka K, et al. Patterns of age-dependent changes in the numbers of lymph follicles and germinal centers in somatic and mesenteric lymph nodes in growing C57B1/6 mice. J Anat. 2001;198: 189-205.
15. Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, et al. Sentinel node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph nodes. Lancet. 1997;349:1864-7.
16. Faries MB, Bedrosian I, Reynolds C, et al. Active macromolecule uptake by lymph node antigen-presenting cells: a novel mechanism in determining sentinel lymph node status. Ann Surg Oncol. 2000;7:98-105.

Endereço para correspondência:
 ROGÉRIO PORTO DA ROCHA
 Av. Ana Costa 120, Vila Mathias
 CEP 11064-003, Santos, SP, Brasil
 Fone: (13) 3221-4244
 E-mail: rogerio@portodarocha.com.br