

Università degli Studi di Napoli Federico II

Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomorfologiche e Chirurgiche

XXXVI Ciclo

Coordinatore: Prof. Alberto Cuocolo



**IL VERDE INDOCIANINA COME TRACCIANTE PER L'IDENTIFICAZIONE DEL
LINFONODO SENTINELLA IN CORSO DI CHIRURGIA PER CARCINOMA
DELLA MAMMELLA: CONFRONTO CON IL TECNEZIO-99M**

Relatore:

Ch.mo Prof. Mario Musella

Candidato:

Dott. Nunzio Velotti

Indice

1. INTRODUZIONE

- 1.1 La biopsia del linfonodo sentinella** ...pag. 2
- 1.2 La biopsia del linfonodo sentinella guidata dal Verde Indocianina (ICG)** ...pag. 3
- 1.3 Obiettivi dello studio** ...pag. 4

2. MATERIALI E METODI

- 2.1 Disegno e popolazione dello studio** ...pag. 5
- 2.2 Outcomes** ...pag. 5
- 2.3 Trattamento pre ed intra-operatorio** ...pag. 5
- 2.4 Analisi statistica** ...pag. 6

3. RISULTATI ...pag. 7

4. DISCUSSIONE ...pag. 11

BIBLIOGRAFIA ...pag. 13

1. INTRODUZIONE

1.1 La biopsia del linfonodo sentinella

La stadiazione dell'ascella è un pilastro importante nel trattamento chirurgico del carcinoma mammario. Inizialmente veniva eseguita una invasiva dissezione dei linfonodi ascellari (ALND) che oggi trova indicazione solo in casi selezionati. Questa procedura, infatti, è stata soppiantata da quando studi randomizzati hanno dimostrato che la biopsia del linfonodo sentinella (SLNB) riflette lo stato generale dei linfonodi ascellare. Non è stata riscontrata alcuna differenza nel controllo loco-regionale, nella sopravvivenza libera da malattia (DFS) e nella sopravvivenza globale (OS) tra SLNB e ALND nei pazienti con linfonodi clinicamente negativi. [1,2] Inoltre, è stato evidenziato nei pazienti sottoposti a SLNB un miglioramento della qualità della vita (QoL) e della funzione degli arti superiori. [3,4] Questi risultati hanno reso il SLNB lo standard di cura per la stadiazione dell'ascella nelle pazienti con carcinoma mammario in fase iniziale e nelle pazienti con ascella clinicamente negativa.[5]

Per un rilevamento ottimale delle SLN, vengono utilizzati dei traccianti specifici. Gli attuali traccianti standard presentano, però, diverse limitazioni: ad esempio, le questioni logistiche e legislative legate all'utilizzo di un radioisotopo limitano l'applicazione del metodo del tracciante radioattivo in molti paesi/regioni del mondo.

In diversi paesi in via di sviluppo, inclusa la Cina, per la SLNB è disponibile solo il colorante blu.[6] Il colorante blu comporta un rischio di reazioni allergiche in circa l'1% dei pazienti e nello 0,2% si tratta di reazioni gravi.[7] Inoltre, le prestazioni del blu di metilene nel SLNB dipendono fortemente dall'esperienza del chirurgo, privo della guida di dispositivi come una sonda gamma utilizzata, invece, nel SLNB guidato da radioisotopi. Le potenziali limitazioni sopra menzionate di entrambi i traccianti standard hanno portato allo sviluppo di metodi

alternativi per SLNB. I primi dati ottenuti da studi sull' utilizzo del verde indocianina (ICG) e del SLNB guidato da ossido di ferro superparamagnetico (SPIO) sono incoraggianti.

1.2 La biopsia del linfonodo sentinella guidata dal Verde Indocianina (ICG)

Negli ultimi 10 anni, la biopsia del linfonodo sentinella guidata da ICG è diventata una metodica ampiamente usata. Con tale approccio, SLNs vengono identificati dalla fluorescenza emessa dal mezzo che si accumula nei linfonodi stessi. Questa fluorescenza può esser visualizzata in tempo reale su monitor, anche attraverso la cute, fornendo una mappa per l'identificazione del SLN. Per il SLNB guidato da fluorescenza, si utilizza una sistema basato su una camera in grado di rilevare la fluorescenza near-infrared (NIR);[8] ne esistono diversi tipi ma in sostanza, il sistema di telecamere per immagini intraoperatorie contiene due diverse sorgenti luminose, diverse lenti ottiche e filtri e rilevatori. Innanzitutto, viene utilizzata una sorgente di luce bianca che illumina il tessuto, fornendo al chirurgo la normale consistenza del colore mentre esegue l'intervento chirurgico. Successivamente, vengono utilizzati laser o diodi emettitori di luce per produrre una eccitazione dei traccianti fluorescenti; l'immagine a luce bianca e l'immagine fluorescente possono essere proiettate simultaneamente. Oltre questo sistema di rilevazione è necessario un tracciante che possa esser somministrato in sicurezza e che si accumuli nei SLNs. Sono stati identificati diversi traccianti ma i traccianti che generano NIR sono quelli che hanno le migliori proprietà per guidare il chirurgo durante l'intervento; questo perché le lunghezze d'onda di eccitazione NIR (750–900 nm) hanno le proprietà di assorbimento e diffusione nei tessuti più basse e generano un'autofluorescenza minima. Ciò porta alla penetrazione nei tessuti fino a 2 cm e un forte rapporto segnale/fondo.[9]

L'ICG, una molecola organica a basso peso molecolare che è stata approvata dalla FDA statunitense e dall'EMA, ha mostrato ottime capacità di rilevamento dei SLNs poiché emette fluorescenza nello spettro NIR (assorbimento 765 nm, emissione 840 nm), fornendo così un'immagine ad elevato rapporto segnale/fondo.[10]

Diversi studi suggeriscono che l'imaging con ICG potrebbe sostituire il blu di metilene nel doppio metodo di mappatura, evitando i suoi potenziali inconvenienti come la necessità di notevole esperienza del chirurgo con la procedura e l'insorgenza di reazioni allergiche. Sono state segnalate reazioni allergiche per iniezione endovenosa di ICG, con un tasso complessivo dello 0,34% e dello 0,05% per reazioni gravi.[11] Sono stati condotti pochissimi studi sugli effetti collaterali della somministrazione non endovenosa di ICG; gli effetti avversi dell'ICG dipendono dalla dose, con un'incidenza molto più elevata di reazioni allergiche quando la dose supera 0,5 mg/kg per peso corporeo. Tuttavia la dose di ICG utilizzata per il SLNB è molto inferiore a 0,5 mg/kg (la dose totale di iniezione varia da 0,0625 mg a 25 mg).[12]

1.3 Obiettivi dello Studio

Il presente studio si pone come obiettivo principale quello di paragonare la sensibilità dell'IGC e la sua eventuale non inferiorità nell'individuare il SLN in corso di biopsia linfonodale ascellare per carcinoma della mammella, rispetto alla stessa procedura eseguita dopo linfoscintigrafia con Tc-99m.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Disegno e popolazione dello studio

Questo studio prospettico di non-inferiorità a singolo braccio, è stato disegnato per valutare il potere diagnostico dell'ICG nell'identificazione del SLN in corso di chirurgia mammaria rispetto al Tc-99m. La popolazione oggetto dello studio includeva donne affette da carcinoma mammario arruolate presso la Breast Unit dell'AOU Federico II di Napoli.

Criteri di inclusione: età superiore a 18 anni; carcinoma invasivo T1 o T2 della mammella confermato mediante core-biopsy, ascella clinicamente negativa confermata allo studio radiologico pre-operatorio.

Criteri di esclusione: documentata allergia a mezzi di contrasto iodati, all'ICG o al Tc-99m; indicazioni alla mastectomia; pregressa chirurgia alla mammella o all'ascella omolaterale; tumori T3 confermati allo studio pre-operatorio; pazienti sottoposte a terapia neoadiuvante; gravidanza; allattamento; incapacità a fornire consenso informato.

2.2 Outcomes

Outcome principale dello studio è la valutazione del tasso di identificazione del SLN con ICG e confronto con il tasso di identificazione ottenuto mediante marcatura con Tc-99m.

Outcome secondario è stato la valutazione di eventuali eventi avversi correlati all'utilizzo dell'ICG.

2.3 Trattamento pre ed intra-operatorio

Accertata la diagnosi di tumore della mammella con stadiazione clinica N0 mediante metodiche di imaging validate e verificati i criteri di inclusioni, le pazienti possono esser arruolate per lo studio. Il giorno prima dell'intervento chirurgico le pazienti sono state

sottoposte ad iniezione standard di Tc-99m con attività misurata di 37 MBq in sede perilesionale. Il giorno dell'intervento è stata effettuata iniezione di ICG in sede peri-tumorale (1 ml di soluzione con ICG 0,5 %) e, successivamente, seguendo la traccia fluorescente sottocutanea, è stato rimosso il linfonodo nel quale, per primo, si visualizza l'ingresso della traccia fluorescente che è stato identificato come sentinella. Tale linfonodo è stato poi testato anche con gamma-sonda per confermare la massima radioattività rispetto agli altri linfonodi ascellari. L'identificazione nella fluorescenza NIR dell'ICG è stata rilevata con lo strumento OrbEye (Olympus s.p.a.)

Le procedure chirurgiche sono state eseguite dagli stessi due operatori esperti in chirurgia mammaria (più di 50 casi l'anno) che, seguendo il disegno dello studio, erano autorizzati ad asportare al massimo 3 linfonodi per paziente.

2.4 Analisi statistica

Sulla scorta della letteratura pregressa,[13] il tasso di identificazione del SLN è descritto tra il 90% e il 95%. Abbiamo considerato accettabile un tasso di identificazione maggiore o uguale al 95% ed inaccettabile un tasso di identificazione inferiore all' 85%. Assumendo $\alpha=0.05$ e $\beta=0.10$, il numero minimo di pazienti richiesti per lo studio risultava esser di 40 soggetti arruolati.

Le variabili continue sono state riportate come media $\pm$ deviazione standard e sono state comparate con U test di Mann-Whitney; le variabili categoriche sono state riportate come percentuali ed analizzate con test esatto di Fisher.

Il tasso di concordanza tra i due traccianti è stato presentato come frequenze. Il tasso di identificazione è stato definito come proporzione di pazienti nei quali almeno 1 linfonodo veniva identificato con entrambi i traccianti.

Tutte le indagini statistiche sono state effettuate utilizzando il software IBM SPSS v. 26 (SPSS; IBM Corp.) ed è stato considerato statisticamente significativo un valore di p minore di 0,05.

3. RISULTATI

Quarantacinque pazienti consecutivi sono stati arruolati per il presente studio. Due pazienti hanno negato il consenso mentre in 3 pazienti è stata indentificata una seconda lesione nella stessa mammella e sono state trattate con mastectomia. Il termine dell'arruolamento ha dunque previsto 40 pazienti.

L'età media era di 61.2 anni, la maggior parte delle pazienti erano in post-menopausa (31, 77.5%). Per quanto riguarda la tipologia di tumore, in 27 casi si è trattato di tumori pT1 (67.5%) ed in tutti i casi si è trattato di tumori No Special Type (NST). Questi dati sono riassunti nella Tabella 1.

<i>Caratteristica</i>	<i>Valori</i>
Età (anni)	61.2 ± 3.4
Pre-menopausa (n, %)	9 (22.5%)
Post-menopausa (n, %)	31 (77.5%)
Tumori pT1 (n, %)	27 (67.5%)
Tumori pT2 (n, %)	13 (32.5%)

Tabella 1. Caratteristiche demografiche ed oncologiche dei 40 pazienti arruolati

I linfonodi ascellari sono stati visualizzati già attraverso la cute, dopo iniezione di ICG, in 4 casi (10%) mentre in 25 casi (62.5%) erano visibili solo i vasi linfatici (Figura 1).

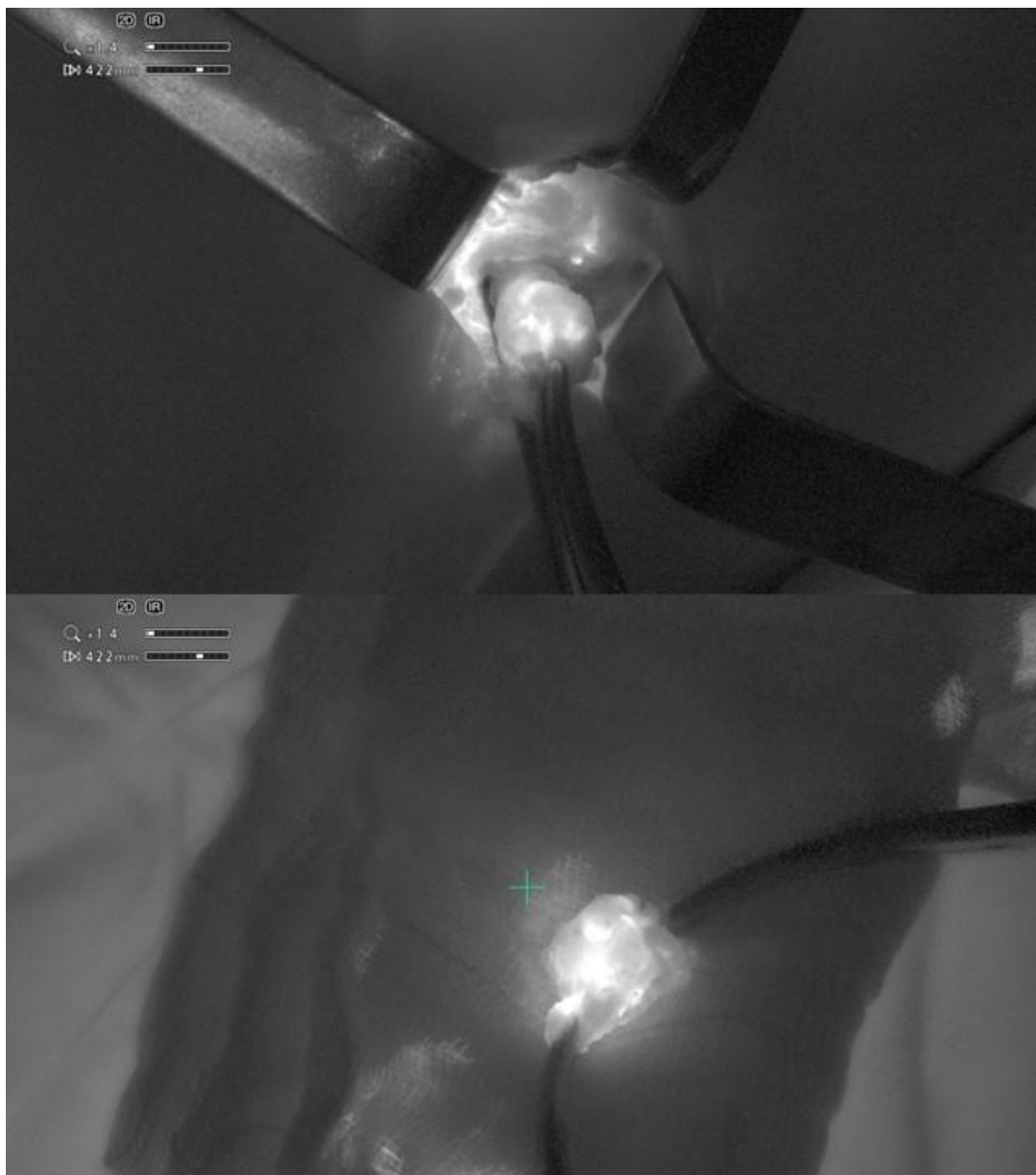


Figura 1. Visualizzazione della fluorescenza NIR dopo iniezione di ICG

Per quanto riguarda la concordanza tra i due metodi di tracciamento del SLN, sono stati biopsizzati 67 SLNs; di questi, 62 (92.5%) mostravano fluorescenza dopo ICG e 58 (86.6%) erano positivi al Tc-99m. La concordanza tra i due mezzi è stata registrata in 55 SLNs (82.1%)

mentre in 3 casi c'era solo assorbimento di Tc-99m (4.5%) ed in 7 casi c'è solo fluorescenza da ICG (10.4%). (Tabella 2)

Rispetto alle 40 biopsie di SLNs effettuate, in 38 biopsie (95%) è stato identificato almeno 1 SLN con ICG ed in 35 biopsie (87.5%) con Tc-99m. Combinando le due metodiche, in 39 casi (97.5%) è stato identificato il linfonodo sentinella da almeno 1 dei due traccianti.

	Tc +	Tc -	Totale
ICG +	55 (82.1%)	7 (10.4%)	62 (92.5%)
ICG -	3 (4.5%)	2 (3%)	5 (7.5%)
Totale	58 (86.6%)	9 (13.4%)	67 (100%)

Tabella 2. Tasso di concordanza tra le due tecniche di identificazione del SLN

La procedura di iniezione dell'ICG è stata ben tollerata in tutti i pazienti e non è stato registrato alcun evento avverso.

4. DISCUSSIONE

Questo studio mostra chiaramente la non inferiorità dell'ICG rispetto al Tc-99m nell'identificazione del linfonodo sentinella in corso di chirurgia per carcinoma della mammella. Il tasso di concordanza tra le due metodiche è stato del 82.1% ed il tasso di identificazione di almeno 1 linfonodo è stato del 95% per l'ICG e del 87.5% per il Tc-99m.

I risultati ottenuti sono sovrapponibili a quelli della letteratura pregressa: il trial ALMANAC ha sancito un tasso di identificazione del SLN per il Tc-99m del 85.6%.[14] Studi successivi hanno dimostrato che tale percentuale si può attestare tra il 90% ed il 95%;[15,16] una simile variabilità può esser spiegata dal fatto che non c'è ancora accordo generale sulla quantità di segnale che la sonda-gamma deve leggere per definire un linfonodo come linfonodo sentinella.

Per quanto riguarda l'ICG come metodica di identificazione del linfonodo sentinella, sono state pubblicate due recenti meta-analisi che hanno attestato un tasso di identificazione paragonabile a quello del Tc-99m e superiore al blu di metilene.[17,18] L'ICG ha mostrato tassi di rilevazione variabili tra il 92.7% ed il 100%;[19,20] il motivo di dati così discordanti deve esser ricercata nell'enorme eterogeneità degli studi pubblicati in termini di metodica di iniezione, quantità di ICG iniettate ed sistema di rilevazione della fluorescenza utilizzato.

Molti autori hanno proposto, per ridurre il tasso di falsi negativi, di utilizzare contemporaneamente due traccianti.[21] Nel nostro studio, il tasso di identificazione combinato dell'ICG con il Tc-99m era del 97.5% contro il 95% dell'ICG da solo; questa inconsistente differenza rende giustizia dell'ipotesi che l'aggiunta di un secondo tracciante all'ICG determina solo un aumento del rischio di eventi avversi.

Anche se non sono stati condotti studi prospettici randomizzati su larga scala per confrontare questa nuova tecnica con il metodo di mappatura standard del SLN, i risultati derivanti da studi prospettici di coorte indicano che l'ICG può fornire un buon tasso di identificazione e un accettabile False Negative Rate (FNR). [22, 23]

Alla luce dei dati di letteratura sempre più consistenti, anche l'ESMO, nelle sue linee guida sul trattamento del carcinoma mammario, ha adottato la fluorescenza da ICG come possibile tecnica di identificazione del linfonodo sentinella.

La letteratura scientifica ha evidenziato che l'utilizzo di ICG nell'identificazione del SLN ha importanti vantaggi rispetto ai metodi tradizionali: [24, 25] non è necessario ricoverare i pazienti preventivamente perché l'iniezione del mezzo è intra-operatoria; l'ICG non necessita di una medicina nucleare e non è necessario avere un sito di stoccaggio per materiali radioattivi come succede per il Tc-99m. Bisogna inoltre considerare che il costo della procedura eseguita con ICG è circa 5 volte meno costosa della stessa procedura eseguita con Tc-99m; [26] in prima analisi per il costo del farmaco rispetto al radiocomposto, in secondo luogo perché il sistema di rilevazione può esser usato anche per altre applicazioni chirurgiche e quindi va considerato solo come costo una-tantum di partenza.

Gli studi già pubblicati in precedenza hanno evidenziato che il SLNB con ICG ha una curva d'apprendimento più breve del Tc-99m per la possibilità che ha il chirurgo di seguire visualmente la traccia fluorescente che lo guida durante la biopsia. [27] La visualizzazione in tempo reale dei linfatici può, inoltre, aiutare il chirurgo a praticare un'incisione ascellare più precisa e centrata sul segnale fluorescente emanato dal SLN. [28]

Storicamente, grazie al suo basso peso molecolare ed alla sua rapida migrazione attraverso i vasi linfatici, uno dei maggiori dubbi legati all'uso dell'ICG era l'identificazione di un numero eccessivo di SLN. [29,30] Tuttavia, in linea con altri studi, i nostri risultati hanno mostrato una rimozione media di circa 2 linfonodi per paziente con ICG; questo valore è equivalente al numero medio di linfonodi asportati con l'utilizzo di Tc-99m.

In conclusione, in linea con i nostri risultati, emergono prove inequivocabili e sempre più consistenti sulla sicurezza, efficacia, vantaggi finanziari e logistici dell'ICG che può essere utilizzato come tracciante per il SLNB ascellare.

BIBLIOGRAFIA

1. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, Luini A, Zurrida S, Galimberti V, Intra M, Veronesi P, Maisonneuve P, Gatti G, Mazzarol G, De Cicco C, Manfredi G, Fernández JR. Sentinel-lymph-node biopsy as a staging procedure in breast cancer: update of a randomised controlled study. *Lancet Oncol.* 2006 Dec;7(12):983-90.
2. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Costantino JP, Ashikaga T, Weaver DL, Mamounas EP, Jalovec LM, Frazier TG, Noyes RD, Robidoux A, Scarth HM, Wolmark N. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010 Oct;11(10):927-33.
3. Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, Yiangou C, Horgan K, Bundred N, Monypenny I, England D, Sibbering M, Abdullah TI, Barr L, Chetty U, Sinnett DH, Fleissig A, Clarke D, Ell PJ. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2006 May 3;98(9):599-609.
4. Ashikaga T, Krag DN, Land SR, Julian TB, Anderson SJ, Brown AM, Skelly JM, Harlow SP, Weaver DL, Mamounas EP, Costantino JP, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast, Bowel Project. Morbidity results from the NSABP B-32 trial comparing sentinel lymph node dissection versus axillary dissection. *J Surg Oncol.* 2010 Aug 1;102(2):111-8.
5. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, Cochran AJ, Cody HS 3rd, Edge SB, Galper S, Hayman JA, Kim TY, Perkins CL, Podoloff DA, Sivasubramaniam VH, Turner RR, Wahl R, Weaver DL, Wolff AC, Winer EP; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 20;23(30):7703-20.

6. Li J, Jia S, Zhang W, Qiu F, Zhang Y, Gu X, Xue J. Partial axillary lymph node dissection inferior to the intercostobrachial nerves complements sentinel node biopsy in patients with clinically node-negative breast cancer. *BMC Surg.* 2015 Jun 30;15:79.
7. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, Brown AM, Harlow SP, Ashikaga T, Weaver DL, Miller BJ, Jalovec LM, Frazier TG, Noyes RD, Robidoux A, Scarth HM, Mammolito DM, McCready DR, Mamounas EP, Costantino JP, Wolmark N; National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *Lancet Oncol.* 2007 Oct;8(10):881-8.
8. de Boer E, Harlaar NJ, Taruttis A, Nagengast WB, Rosenthal EL, Ntziachristos V, van Dam GM. Optical innovations in surgery. *Br J Surg.* 2015 Jan;102(2):e56-72.
9. Ahmed M, Purushotham AD, Douek M. Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):e351-62.
10. Sugie T, Kinoshita T, Masuda N, Sawada T, Yamauchi A, Kuroi K, Taguchi T, Bando H, Yamashiro H, Lee T, Shinkura N, Kato H, Ikeda T, Yoshimura K, Ueyama H, Toi M. Evaluation of the Clinical Utility of the ICG Fluorescence Method Compared with the Radioisotope Method for Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016 Jan;23(1):44-50.
11. Benson J. Indocyanine Green Fluorescence for Sentinel Lymph Node Detection in Early Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016 Jan;23(1):6-8.
12. Sugie T, Kinoshita T, Masuda N, Sawada T, Yamauchi A, Kuroi K, Taguchi T, Bando H, Yamashiro H, Lee T, Shinkura N, Kato H, Ikeda T, Yoshimura K, Ueyama H, Toi M. Evaluation of the Clinical Utility of the ICG Fluorescence Method Compared with the Radioisotope Method for Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2016 Jan;23(1):44-50.
13. Sorrentino L, Sartani A, Pietropaolo G, et al. A novel indocyanine green fluorescence-guided video-assisted technique for sentinel node biopsy in breast cancer. *World J Surg.* 2018;42:2815–2824

14. Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010; 11:927–933
15. Kim T, Giuliano AE, Lyman GH, Lyman GH. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in early-stage breast carcinoma: a metaanalysis. *Cancer.* 2006;106:4–16
16. Mamounas EP, Brown AF, Anderson S, et al. Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol.* 2005;23:2694–2702
17. Kedrzycki MS, Leiloglou M, Ashrafian H, et al. Meta-analysis comparing fluorescence imaging with radioisotope and blue dye-guided sentinel node identification for breast cancer surgery. *Ann Surg Oncol.* 2021;28:3738–3748.
18. Goonawardena J, Yong C, Law M. Use of indocyanine green fluorescence compared to radioisotope for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Surg.* 2020;220:665–676
19. Micog JS, Troyan SL, Hutteman M, et al. Toward optimization of imaging system and lymphatic tracer for near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011;18:2483–2491.
20. van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, et al. Randomized comparison of near-infrared fluorescence imaging using indocyanine green and 99(m) technetium with or without patent blue for the sentinel lymph node procedure in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2012;19:4104–4111.
21. Shen S, Xu Q, Zhou Y, et al. Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by blue dye with or without indocyanine green in early breast cancer. *J Surg Oncol.* 2018;117:1841–1847

22. Ahmed M, Purushotham AD, Douek M. Novel techniques for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2014 Jul;15(8):e351-62
23. Hirano A, Kamimura M, Ogura K, Kim N, Hattori A, Setoguchi Y, Okubo F, Inoue H, Miyamoto R, Kinoshita J, Fujibayashi M, Shimizu T. A comparison of indocyanine green fluorescence imaging plus blue dye and blue dye alone for sentinel node navigation surgery in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2012 Dec;19(13):4112-6.
24. James TA, Coffman AR, Chagpar AB, et al. Troubleshooting sentinel lymph node biopsy in breast cancer surgery. *Ann Surg Oncol.* 2016;23:3459–3466.
25. Kuehn T, Bauerfeind I, Fehm T, et al. Sentinel-lymph-node biopsy in patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy (SENTINA): a prospective, multicentre cohort study. *Lancet Oncol.* 2013;14:609–618.
26. Dip F, Falco J, Montesinos MR, et al. Cost-effective analysis of near infrared (NIR) vs radiotracer for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *J Am Coll Surg.* 2016;223:e3.
27. Ngô C, Sharifzadehgan S, Lecurieux-Lafayette C, et al. Indocyanine green for sentinel lymph node detection in early breast cancer: prospective evaluation of detection rate and toxicity-The FLUOBREAST trial. *Breast J.* 2020;26:2357–2363
28. Zhou Y, Li Y, Mao F, et al. Preliminary study of contrast-enhanced ultrasound in combination with blue dye vs. indocyanine green fluorescence, in combination with blue dye for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *BMC Cancer.* 2019;19:939
29. Valente SA, Al-Hilli Z, Radford DM, et al. Near infrared fluorescent lymph node mapping with indocyanine green in breast cancer patients: a prospective trial. *J Am Coll Surg.* 2019;228:672–678.
30. Goonawardena J, Yong C, Law M. Use of indocyanine green fluorescence compared to radioisotope for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Am J Surg.* 2020;220:665–676