



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
EL USO DE LA FLUORESCENCIA EN
CIRUGÍA

Autor: Nikol Alexandra Sepúlveda Kaplan

Fecha: Junio 2019

Tutor: Jorge Rubio Retama

ÍNDICE

RESUMEN	Pág. 3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	Pág. 4
OBJETIVOS	Pág. 5
METODOLOGÍA	Pág. 5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
I. FUNDAMENTO DE LA FLUORESCENCIA	
1.1 La fluorescencia a nivel electrónico: El diagrama de Jablonski	Pág. 5
1.2 Transiciones singlete-singlete	Pág. 7
1.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia	Pág. 8
1.4 Factores que afectan/influyen en la fluorescencia	Pág. 8
1.5 Instrumentación	Pág. 10
II. APLICACIONES DE LA FLUORESCENCIA EN CIRURGIA	
1. Cirugía endocrina	Pág. 11
2. Carcinomas hepáticos	Pág. 13
3. Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)	Pág. 14
4. Cáncer colorrectal	Pág. 16
5. Cirugía esofagogástrica	Pág. 17
CONCLUSIONES	Pág. 18
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 19

RESUMEN

La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Las más tempranas observaciones de la fluorescencia fueron descritas en 1565 por Nicolás Monarde. Pero no fue hasta 1852, en que el físico inglés Sir George Stokes le dio como nombre a este fenómeno fluorescencia, derivándolo del mineral fluorita. El uso de la fluorescencia en cirugía se ha ampliado y difundido en los últimos años. Existen actualmente diversas áreas de desarrollo de la aplicación de la fluorescencia en cirugía. Entre las indicaciones más prometedoras destacamos la identificación a través de la fluorescencia en tiempo real de tejido tumoral utilizando sondas fluorescentes cáncer-específicas. El objetivo de mi trabajo artículo es revisar las actuales aplicaciones de la fluorescencia en cirugía.

Palabras claves: Cirugía guiada por fluorescencia. Verde de indocianina. Autofluorescencia. Aplicaciones de fluorescencia. Cetuximab. El péptido RGD. Fluoroforo.

ABSTRACT

The fluorescence is a particular type of luminescence. The excited species relax to the fundamental state, releasing their excess energy in the form of photons. The earliest observations of fluorescence were described in 1565 by Nicolás Monarde. But it was not until 1852, in which the English physicist Sir George Stokes gave as name to this phenomenon fluorescence, tapping of the mineral fluorite. The use of fluorescence in surgery has expanded and become widespread in recent years. There are currently different areas of fluorescence application development in surgery. Among the most promising indications we emphasize the identification through real-time fluorescence of tumour tissue using cancer-specific fluorescent probes. The objective of my article is to review the current applications of fluorescence in surgery.

Keywords: Fluorescence-guided surgery. Indocyanine green. Autofluorescence. Fluorescence applications. Cetuximab. The RGD peptide. Fluoroforo.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La fluorescencia es la emisión de radiación por parte de algunos compuestos que previamente han sido expuestos a una fuente lumínica. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones.

Las más tempranas observaciones de la fluorescencia fueron descritas por Nicolás Monarde (Sevilla, 1508 -1588) en el año 1565. El describió el extraordinario color azul intenso de un extracto procedente de madera al ser iluminada con luz solar, mientras que era casi transparente al ser observada con la luz de una lámpara. Sin embargo, los verdaderos descubridores fueron el pueblo Azteca, que ya conocía las propiedades de esta planta, también conocida como "Palo de Jada", y que llegó como otras muchas especies vegetales y conocimientos de botánica desde el otro lado del océano. Y al estudio de estas nuevas especies dedicó Monarde su vida (1). Al comienzo del siglo 18 los mineralogistas Clarke y Herschel describieron la fluorescencia detectada en los minerales. En 1819, Edward D. Clarke describió la fluorescencia en las fluoritas y, años más tarde, David Brewster y John Herschel hicieron lo mismo con la clorofila y quinina respectivamente. Aunque este fenómeno había sido estudiado por varios científicos, no fue hasta 1852, en que el físico inglés Sir George Stokes usando filtros y prismas para separar las diversas longitudes de onda de la luz demostró que una parte del espectro de la luz incidente era absorbida, transformada y emitida por la solución en forma de una luz azul de mayor longitud de onda. Su trabajo se basó en el estudio la fluorita y los cristales de sales de uranio. El vio que los materiales tenían el poder de convertir la radiación ultravioleta invisible en radiación de longitud más grande que es visible. Al fenómeno observado le dio nombre fluorescencia derivado del mineral fluorita. (2)

Existen muchos compuestos naturales y sintéticos que emiten la luz fluorescente y tienen un sinnúmero de aplicaciones prácticas. En el campo de la medicina y en otras ciencias relacionadas ha ido creciendo el número de aplicaciones de la fluorescencia, siendo muy utilizadas las de biomarcaje. Desde hace tiempo se han venido realizando numerosos estudios dirigidos a desarrollar marcadores visuales para la detección de tumores con el fin de mejorar los resultados clínicos. El objetivo de la cirugía es reseca tanto tumor como sea posible pero sin dañar el tejido sano vecino ya que, con frecuencia, la extirpación es complicada a causa de la naturaleza del tumor y de su localización. Es muy difícil definir durante la cirugía los márgenes tumorales ya que en muchos casos no suele haber una clara demarcación entre el tumor y el tejido normal. Pero el uso de la fluorescencia en cirugía ha permitido visualizar estructuras invisibles a simple vista, evaluar procesos metabólicos o la perfusión de un tejido, tras la administración de un fluoróforo o en algunos casos, sin la necesidad de administrar de compuestos ajenos debido a la capacidad de autofluorescencia de determinadas estructuras en el organismo. La mejora de la imagen con fluorescencia puede ayudar a prevenir lesiones inadvertidas durante procedimientos quirúrgicos de estructuras anatómicas críticas que incluyen el árbol biliar, nervios, uréteres, etc. En el contexto de la cirugía de precisión, el desarrollo de contrastes fluorescentes tumor-específicos ha avanzado de una forma importante en los últimos años y permite la identificación mejorada de tumor residual y de metástasis (3).

OBJETIVOS

En los últimos años el uso de la fluorescencia en cirugía se ha ampliado presentando un impacto cada vez más apreciable en la sociedad actual. Cada vez son más los artículos que describen su uso en los distintos campos de la cirugía. Debido a que existe un interés creciente en el uso de fluorescencia, el objetivo primordial de mi trabajo es ofrecer una revisión acerca de las actuales aplicaciones de la fluorescencia en cirugía, así como las ventajas terapéuticas obtenidas con su uso frente al de los métodos convencionales.

METODOLOGÍA

Para realizar este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica en las diferentes bases de datos de la índole científico-médica relacionadas con el estudio: *Pubmed/Medline*, *ScienceDirect*, *Wiley Online Library*, libros y publicaciones especializadas en química analítica, fisicoquímica. Los recursos bibliográficos que he consultado aparecen reflejados en el apartado "bibliografía". Las palabras clave empleadas como método de filtro de información son: "fluorescencia", "aplicaciones de fluorescencia", "cirugía guiada por fluorescencia", "sondas fluorescentes".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.FUNDAMENTO DE LA FLUORESCENCIA

1.1 La fluorescencia a nivel electrónico: El diagrama de Jablonski

La fluorescencia es el proceso en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética. Las especies excitadas vuelven al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. (4) La radiación electromagnética provoca las transiciones entre los niveles de energía cuantizados del sistema material que dan lugar al espectro. (4) Cuando una sustancia absorbe radiación VIS-UV pasa a un estado electrónico excitado. La molécula en el estado excitado puede volver al estado fundamental a través de transiciones radiativas y no radiativas que llevan consigo colisiones con otras moléculas. Lo más común es que se transfiera a la vibración, rotación y translación de las moléculas del entorno. O también hay una serie de compuestos en los que la pérdida de energía no solo tiene lugar en forma de calor sino también emitiendo radiación. Este fenómeno se conoce como fotoluminiscencia. Según como sea la emisión de radiación, se distinguen distintos procesos luminiscentes: fluorescencia o fosforescencia. La diferencia entre ellos está en relación con la multiplicidad de los orbitales. También los podemos distinguir por el tiempo que transcurre entre la absorción y la emisión. La fluorescencia es una conversión inmediata de la radiación absorbida, mientras que en la fosforescencia la energía sale lentamente (5). Lo más normal es que la radiación emitida sea de longitud de onda más larga y de menor energía que la absorbida, este desplazamiento hacia longitudes de onda más largas se denomina desplazamiento de Stokes. El espectro de excitación es la relación entre la longitud de onda de excitación y la amplitud de emisión, dado que una sustancia no se excita por cualquier longitud de onda. Para analizar el fenómeno de la fluorescencia a nivel atómico-molecular se utiliza el diagrama de Jablonski. Las líneas horizontales representan los distintos niveles vibracionales de los diferentes niveles electrónicos; el singlete fundamental- S₀, los

singletes excitados: S1 y S2 o el triplete excitado- T1. También en el diagrama de Jablonski las transiciones radiativas se indican por líneas verticales sólidas, y las no radiativas por las líneas onduladas.

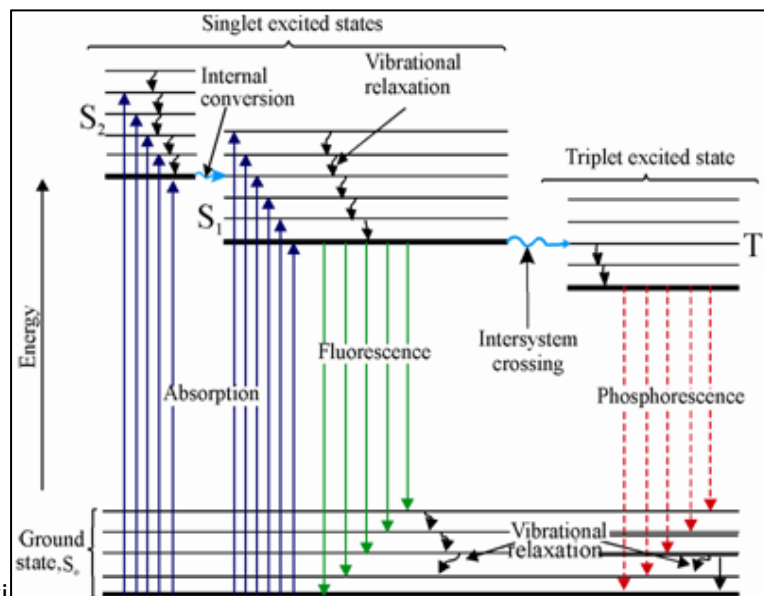


Figura 1. Diagrama de Jablonski

Para que pueda ocurrir la fluorescencia es necesario que la especie primero absorba la radiación de la longitud de onda adecuada. Así, algunos electrones pasan de estados vibracionales y electrónicos fundamentales (S_0) a los correspondientes estados excitados (S_1 , S_2 ... según la cantidad de energía absorbida).

La conversión interna es un ejemplo de una transición no radiativa inducida por colisiones, es un paso de desde estado vibracional elevado de estado excitado a un nivel vibracional más bajo. Una vez alcanzado este estado vibracional más bajo de S_1 pueden ocurrir varias cosas. En uno de los casos la molécula sufre la transición radiativa desde nivel S_1 a S_0 emitiendo un fotón. Este paso tiene nombre de la fluorescencia. Y a su vez el paso de T_1 a S_0 tiene nombre de fosforescencia. La otra posibilidad es que la molécula sufre una transición no radiativa a un estado vibracional excitado de T_1 en un proceso denominado cruce entre sistemas. La diferencia entre los fenómenos luminiscentes (fluorescencia y fosforescencia) se encuentra como hemos dicho anteriormente, en el tiempo de emisión de radiación: la emisión de fluorescencia es un proceso muy rápido que tiene lugar ($10^{-11} - 10^{-9}$ s), la emisión en fosforescencia es más lenta (superior a 10^{-3} s). El camino favorecido hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida del estado excitado. Por lo tanto la fluorescencia se verá más favorecida que la fosforescencia. Por otro lado, si la desactivación no radiante tiene una constante de velocidad más favorable, la fluorescencia desaparece o es menos intensa.

Para la mayoría de los compuestos fluorescentes, la radiación se produce por una transición $n \rightarrow \pi^*$ o $\pi \rightarrow \pi^*$, dependiendo cuál de ellas sea la menos energética. Las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ requieren de pares de electrones no enlazantes y de enlaces múltiples. Dicha transición se produce en moléculas con los siguientes grupos químicos: carbonilos, nitro, azo, imino, halocarbonos insaturados. Las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ requieren enlaces múltiples y ocurren en alquenos, alquinos y compuestos aromáticos. (6)

1.2 Transiciones singlete-singlete

Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. **Fotón** es la partícula elemental responsable de las manifestaciones cuánticas del fenómeno electromagnético. Cada fotón transporta la energía, dada por la siguiente ecuación. $E=h \times \nu$. En las transiciones radiativas un fotón se absorbe o emite.

Los **procesos fotofísicos** incluyen la relajación energética tras la absorción de la luz. El estado fundamental generalmente es un estado singlete y los estados excitados suelen ser sigletes o triples. En el caso de la fluorescencia es singlete. La fluorescencia conlleva consigo la vuelta al estado fundamental se puede ver como una reacción: $S1 \rightarrow S0 + h\nu$.

Y la velocidad de dicha reacción vendrá dado por $Kf[S1]$. La intensidad de la fluorescencia I_f depende de la velocidad de la fluorescencia dada por: $I_f = Kf[S1]$. (7)

La **ley de Beer-Lambert** relaciona la intensidad de la luz incidente (I_0) con la de la luz transmitida (I_t). También según dicha ley la intensidad absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del compuesto analizado es decir, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra.

La expresión de la ley de Lambert-Beer es: $\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) = -\epsilon Lc$

La relación de I_t/I_0 depende principalmente de la concentración (C) y la longitud del camino (L). El coeficiente de extinción molar E es una medida de la fuerza de la transición. Es independiente de la longitud del camino y de la concentración y es la característica propia del cromóforo. Integrando la ecuación de la ley de Beer sacamos la siguiente: $A = C \times \epsilon \times L$

Tanto la absorbancia de la muestra (A) como la absorptividad molar o el coeficiente de absorción molar (ϵ) dependen de la frecuencia y el valor de ϵ medio en el máximo de la línea espectral (ϵ_{max}) está determinado para la mayoría de cromóforos. (8)

Cromóforo	Ejemplo	Solvente	$\lambda_{m\acute{a}x}$ nm	$\epsilon_{m\acute{a}x}$	Tipo de transición
Alqueno	$C_6H_{13}CH=CH_2$	<i>n</i> -Heptano	177	13 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alquino	$C_5H_{11}C\equiv C-CH_3$	<i>n</i> -Heptano	178	10 000	$\pi \rightarrow \pi^*$
Carbonilo	$\begin{array}{c} CH_3CCH_3 \\ \\ O \end{array}$	<i>n</i> -Hexano	196	2000	—
			225	160	—
			186	1000	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	16	$n \rightarrow \pi^*$
Carboxilo	$\begin{array}{c} CH_3CH \\ \\ O \end{array}$	<i>n</i> -Hexano	180	grande	$n \rightarrow \sigma^*$
			293	12	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	CH_3COOH	Etanol	204	41	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	$\begin{array}{c} CH_3CNH_2 \\ \\ O \end{array}$	Agua	214	60	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	$CH_3N=NCH_3$	Etanol	339	5	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	CH_3NO_2	Isooctano	280	22	$n \rightarrow \pi^*$
Nitroso	C_4H_9NO	Eter etílico	300	100	—
			665	20	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrato	$C_2H_5ONO_2$	Dioxano	270	12	$n \rightarrow \pi^*$

Figura 2. El cuadro con las características de absorción de algunos cromóforos comunes

La **potencia de la radiación fluorescente** (F) es proporcional a la potencia radiante del haz de excitación que es absorbido por el sistema.

$$F = K' \times (P_0 - P)$$

donde:

P_0 es la potencia del haz incidente sobre la disolución y P es su potencia después de atravesar la longitud b del medio. La constante K' depende de la eficacia cuántica del proceso de fluorescencia. Para poder relacionar la radiación fluorescente con la concentración sustituimos la ecuación de la ley de Beer de la siguiente manera

: $\frac{P}{P_0} = 10^{-\epsilon b C}$ $F = K' P_0 (1 - 10^{-\epsilon b C})$. Y tras de desarrollar el término exponencial como una serie de Taylor hemos obtenido: $F = K' P_0 \times 2,303 \epsilon b C$. Podemos aplicarla siempre que $2,303 \epsilon b C < 0,05$, en el caso que la concentración es demasiado elevada como para que la absorbancia multiplicada por 2,303 sea mayor que 0,05, no se puede aplicar la sustitución que acabamos de hacer. (9) Otros dos factores, responsables también de las desviaciones negativas a elevadas concentraciones, son la autoamortiguación y la autoabsorción. La autoamortiguación es el resultado de colisiones entre moléculas excitadas, a mayor concentración, y la autoabsorción tiene lugar cuando la radiación emitida atraviesa la disolución y es reabsorbida por otras moléculas fluorescentes.

1.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es la relación entre el número de moléculas que emiten fluorescencia respecto al número total de moléculas excitadas. También el rendimiento cuántico también puede ser expresado en función de los fotones emitidos respecto de los fotones absorbidos.

$$\frac{K_f}{K_f + \sum K_i} = \phi$$

Donde K_f es la constante de fluorescencia y $\sum K_i$ es la suma de constantes de velocidad de los procesos de desactivación del estado excitado singulete más bajo que compiten con la fluorescencia. Las moléculas altamente fluorescentes, por ejemplo, la fluoresceína, tienen eficiencias cuánticas que, en ciertas condiciones, se aproximan a la unidad. Las especies no fluorescentes tienen eficiencias que son prácticamente cero.

1.4 Factores que afectan/influyen en la fluorescencia

La intensidad de fluorescencia depende de una multitud de factores que pueden influir, de manera muy notable.

- Estructura molecular

Para que una molécula pueda presentar fluorescencia debe poder absorber la radiación UV (ultravioleta) o la radiación visible. Como la regla, cuanto más radiación absorba más intensa será su fluorescencia. La fluorescencia más intensa y la más útil es la que presentan los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos ($\pi \rightarrow \pi^*$). Así que, las moléculas con dobles enlaces conjugados, especialmente las que tienen gran energía de resonancia, sí suelen ser fluorescentes. Los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados pueden presentar también fluorescencia. La mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos son fluorescentes en disolución, a su vez la eficacia cuántica aumenta con el número de anillos y con su grado de conjugación (o grado de condensación). La sustitución en el anillo aromático influye sobre la longitud de onda de excitación (λ_{exc}), la longitud de onda de emisión (λ_{em}). También influye sobre el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ).

Los sustituyentes de carácter aceptor de electrones disminuyen la fluorescencia:

- -NO₂

- -Cl
- -Br
- -COOH

Y los de carácter donador de electrones aumentan la fluorescencia.

- -OH
- -NH₂

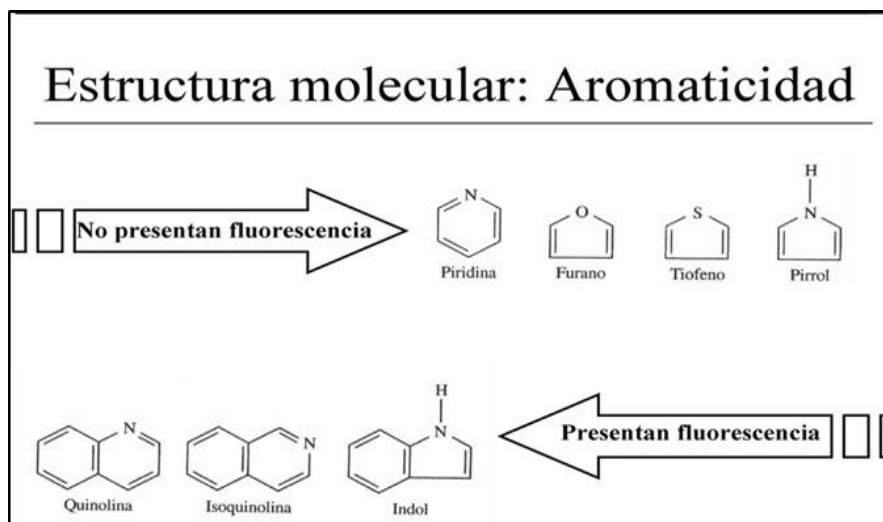


Figura 3. La influencia de los sustituyentes de carácter aceptor y los de donador sobre la fluorescencia.

- Rigidez estructural

La rigidez molecular es un factor que influye notablemente en la intensidad de la fluorescencia producida. La fluorescencia está favorecida en moléculas que poseen estructuras rígidas. La rigidez reduce las posibilidades de relajación por vías vibracionales permitiendo que se produzca la emisión fluorescente. Y por lo tanto, la falta de rigidez de la molécula hace que aumente la velocidad de conversión interna y, por eso aumenta la probabilidad de desactivación no radiante.

- Efecto del solvente

En general, un aumento de la viscosidad, aumenta el rendimiento cuántico disminuyendo la probabilidad de conversión externa. El aumento de la polaridad también favorece las transiciones ($\pi \rightarrow \pi^*$).

- Efecto de la temperatura

El aumento de la temperatura conlleva consigo aumento de la frecuencia de las colisiones, y por lo tanto en estos compuestos se verá favorecida la desactivación no radiante (conversión externa).

- Efecto del pH

La fluorescencia se ve muy afectada por la influencia del pH, ya que la emisión puede ser mayor o menor en un medio ácido o básico. Por eso la fluorescencia de un compuesto aromático con sustituyentes ácidos o básicos en el anillo depende normalmente del pH. Tanto la longitud de onda como la intensidad de emisión son diferentes para la forma ionizada y no ionizada del compuesto. Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo dependen del número de formas resonantes. Cuanto mayor es el número de formas resonantes, mayor

es la estabilidad del primer estado excitado. Por lo tanto, será muy frecuente en los métodos de fluorescencia el control del pH. (10)

1.6 Instrumentación

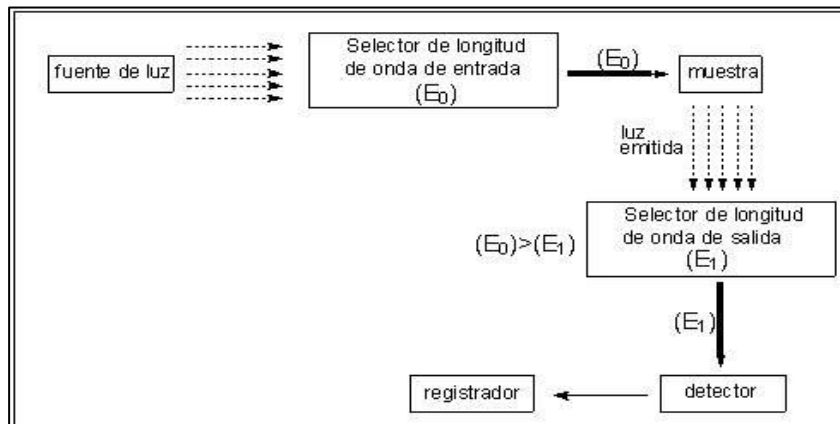


Figura 4. Esquema de un

espectrofluorímetro.

Espectroscopio es cualquier instrumento utilizado para producir o estudiar un espectro. En el caso de proporcionar además de lo anterior una lectura de la longitud de onda o frecuencia de la radiación y al mismo tiempo da también la medida de la intensidad de esa radiación, se suele llamar espectrofotómetro. Y si es utilizado especialmente para medir la fluorescencia, se denomina el espectrofluorímetro. (11) Dichos instrumentos constan de las siguientes partes:

✓ Fuente de luz

Como fuente de excitación. La fuente de luz que ilumina la muestra debe cumplir con las siguientes condiciones: estabilidad, direccionalidad, distribución de energía espectral continua y larga vida. Las fuentes que suelen ser más empleadas son: lámpara de wolframio (también llamado tungsteno), lámpara de arco de xenón, lámpara de deuterio y lámpara LED que se utilizan en los laboratorios. Pero en la mayoría de las aplicaciones se necesita una fuente más intensa que las lámparas de wolframio o de deuterio utilizadas para la medida de absorción. Esto se debe a que la magnitud de la señal de salida, y por tanto la sensibilidad, es directamente proporcional a la potencia de la fuente P_0 . Por eso la fuente utilizada debe ser suficientemente potente. Normalmente se utiliza una lámpara de arco de xenón o de mercurio.

✓ Monocromador de excitación:

Un monocromador es un dispositivo que sirve para medir la composición de la luz según su distribución espectral. El primer monocromador (selector de longitud de onda de entrada) selecciona una longitud de onda de excitación, y la fluorescencia se examina con un segundo monocromador (selector de longitud de onda de salida).

✓ Detector

Como la señal de fluorescencia típica es de baja intensidad se necesitan unos dispositivos especiales para amplificarla. Es un dispositivo cuya función es contar el flujo de fotones

emitido por la muestra a la longitud de onda seleccionada. Los tubos fotomultiplicadores son los más utilizados como detectores en instrumentos de fluorescencia sensibles.

✓ Cubetas

Para medidas de fluorescencia se utilizan tanto cubetas cilíndricas como rectangulares fabricadas con vidrio o más normalmente con sílice.

III. APLICACIONES DE LA FLUORESCENCIA EN CIRURGIA

La cirugía guiada por fluorescencia es una técnica de imagen basada en la óptica que permite la visualización de estructuras invisibles para el ojo humano, así como evaluar actividades dinámicas como es la perfusión de los órganos. La imagen fluorescente se obtiene tras la administración de contraste fluorado, el cual puede emitir una señal fluorescente cuando se excita adecuadamente mediante un haz de luz tipo láser. La señal fluorescente puede ser visualizada directamente en el campo operatorio, en procedimientos quirúrgicos abiertos, o puede ser captada por una cámara y proyectarse en una pantalla, en el contexto de la cirugía mínimamente invasiva. Se adapta fácilmente a las necesidades de la actividad quirúrgica, ya que no requiere una tecnología voluminosa y provee de imágenes en tiempo real, sin alterar el ritmo habitual del quirófano.

1. Cirugía endocrina

La cirugía endocrina se encarga del tratamiento de las enfermedades que afectan a los órganos encargados de producir las hormonas, principalmente la glándula tiroides, las glándulas paratiroides y la glándula suprarrenal. Actualmente existen diversas aéreas de desarrollo de la aplicación de la fluorescencia en cirugía endocrina. Podemos destacar el uso de la fluorescencia con verde de indocianina en cirugía suprarrenal, la identificación y predicción de la perfusión paratiroidea con verde de indocianina, y la autofluorescencia de las glándulas paratiroides. (12)

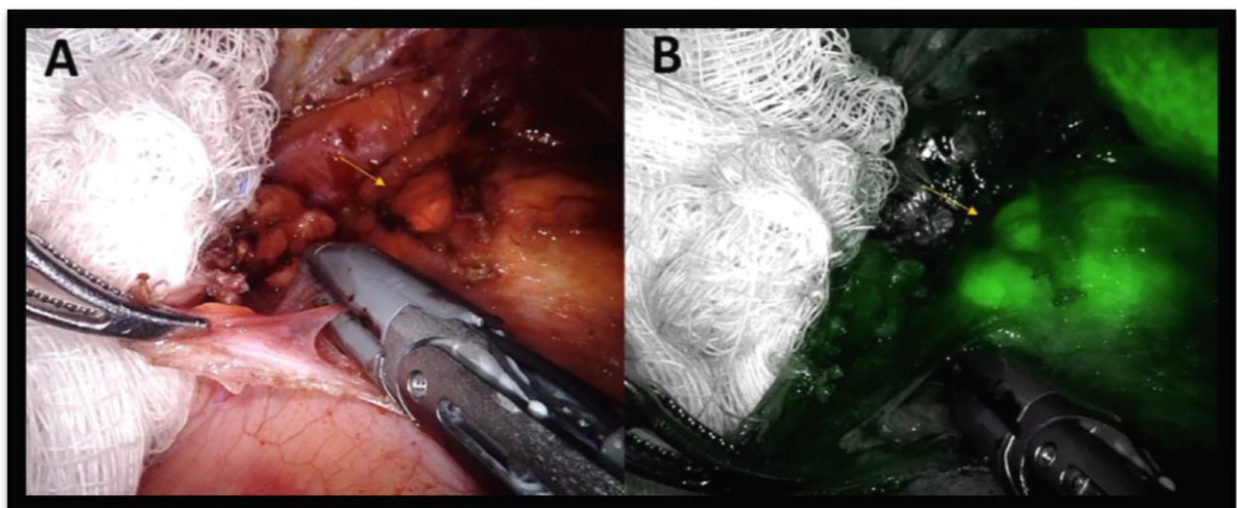


Figura 5. Fotos intraoperatorias de a las glándulas suprarrenales hiperfluorescentes. A. vista laparoscópica. B. vista de fluorescencia

✓ Verde de indocianina (ICG)

El verde de indocianina (ICG) se ha utilizado ampliamente para fines clínicos desde su aprobación por FDA en 1954. Desde el punto de vista de su fluorescencia, la ICG es excitada entre 800 y 980 nm y emite entre 980 y 1000 nm. Tras su inyección intravenosa, viaja unido a proteínas plasmáticas, es rápidamente depurado por el hígado sin metabolizarse y apenas presenta la absorción tisular.

La primera cirugía de glándula suprarrenal guiada por ICG fue descrita en 2013 por Manny TB, Pompeo AS, Hemal AK con una serie de 3 casos en los que se realizó resección parcial de la glándula mediante abordaje robótico y el dispositivo Firefly® (Intuitive Surgical, Inc., Sunnyvale, CA, EE. UU.) tras la administración de 2,5mg de ICG intravenosos. Vieron una menor fluorescencia en las masas adrenales respecto al tejido glandular sano. También en 2015 DeLong JC, Chakedis JM, Hosseini A realizaron una serie de 4 adrenalectomías guiadas por ICG con el dispositivo Pinpoint® (Novadaq Technologies, Inc., Mississauga, ON, Canadá). Durante el estudio pudieron definir el orden de visualización de la fluorescencia. Las arterias suprarrenales son las que primero emiten fluorescencia, seguidas del parénquima adrenal, y finalmente, de la vena suprarrenal. De esta manera la visualización de la vascularización mediante fluorescencia podría mejorar el control de la misma en las maniobras previas a la suprarrenalectomía con el fin de evitar hemorragias intraoperatorias.

El estudio con mayor número de pacientes implicados lo presentaron Colvin J, Zaidi N, Berber E. Durante dicho estudio realizaron una serie de 43 adrenalectomías por abordaje robótico transabdominal lateral o retroperitoneal. Vieron que los tumores de origen cortical presentaban la hiperfluorescencia mientras que, los de origen medular como el feocromocitoma eran hipofluorescentes respecto al resto de la glándula. Este hecho podría ser de mayor importancia para identificación de dobles adrenalectomías con preservación cortical en feocromocitomas bilaterales. A la vista de los estudios realizados anteriormente podemos decir que el uso del ICG en cirugía endocrina es una técnica bastante segura y eficaz, que permite diferenciar glándulas adrenales hiperfluorescentes del tejido graso circundante y asegurar su disección y resección completa. Además, la visualización de la vascularización adrenal con ICG puede aportar un mayor control de la misma durante las maniobras de disección y así disminuir las tasas de complicaciones hemorrágicas, así como las derivadas de la manipulación glandular. Y el hecho que los tumores medulares presentan la hipofluorescencia podría facilitar las resecciones parciales. (13)

✓ Autofluorescencia

En el año 2011 C. Paras, M. Keller, L. White, J. Phay, A. Mahadevan-Jansen describieron la autofluorescencia que presentan las glándulas paratiroides cuando son iluminadas con luz de infrarrojo cercano, con una emisión de 820nm. Además son hiperfluorescentes en comparación con el tiroides. No se sabe la naturaleza de este fluoróforo endógeno, aunque se piensa que los receptores de calcio o de vitamina D podrían ser responsables.

En el año 2017 B. Kahramangil, E. Berber compararon la visualización de las paratiroides tras infusión intravenosa de ICG con la autofluorescencia paratiroidea en 44 pacientes (22 pacientes con cada técnica). Los resultados del dicho estudio son los siguientes: 95% de las glándulas paratiroides identificadas mediante ICG y el 98% en el grupo autofluorescencia. Sin embargo, el porcentaje de glándulas visualizadas antes de ser identificadas con luz blanca a simple vista fue del 6% en el grupo ICG y del 52% en el grupo autofluorescencia. De acuerdo a estos resultados, los autores dicen que ambas técnicas presentan una similar tasa de

detección de paratiroides pero que la autofluorescencia aporta mayor rapidez que el ICG. El descubrimiento de la autofluorescencia paratiroidea presenta un importante cambio en el campo de la cirugía endocrina guiada por fluorescencia, ya que aporta una mayor rapidez en la detección glandular que el uso de ICG. (14)

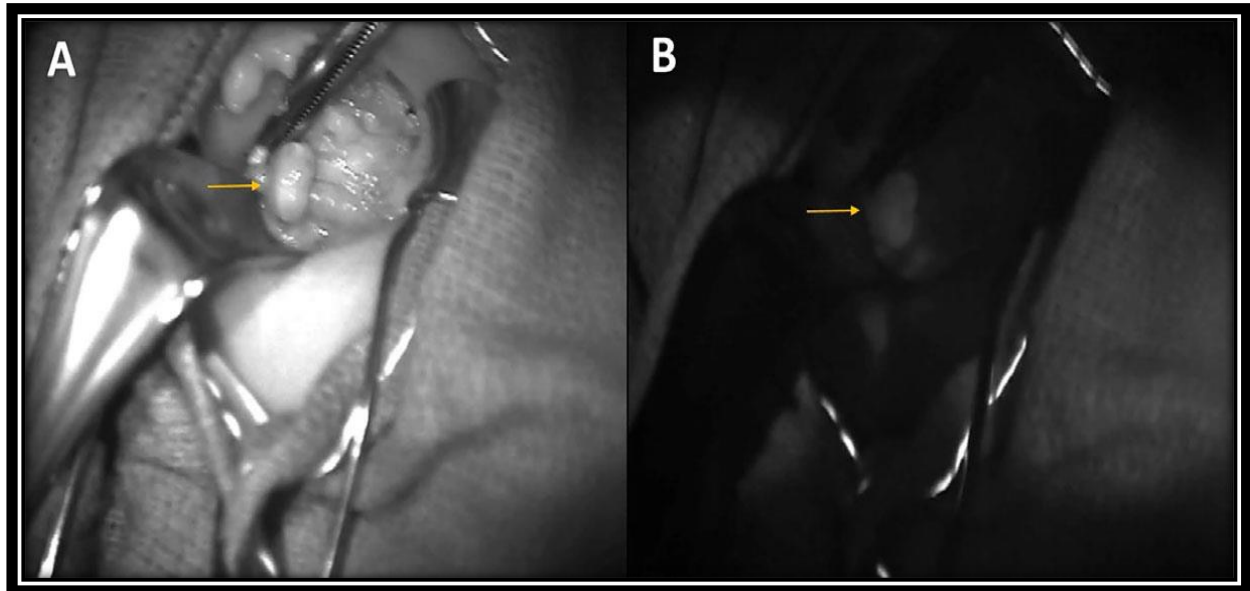


Figura 6. Foto intraoperatoria de la autofluorescencia detectada a partir de un adenoma paratiroideo superior derecho durante Paratiroidectomía. Las flechas apuntan a las glándulas paratiroides.

A. vista A ojo desnudo. B. vista de fluorescencia.

2. Carcinomas hepáticos

El tratamiento principal de los tumores del hígado es la resección hepática. El objetivo primordial en las resecciones tumores hepáticos es el de preservar la máxima función hepática. (15)

✓ Verde de indocianina (ICG)

La obtención de las imágenes basada en el uso de verde de indocianina mejora la visualización del parénquima hepático en la cirugía hepatobiliar. Sin embargo, esta técnica requiere que el cirujano utilice una cámara de mano para capturar las imágenes, estando afectada la calidad de la imagen por el movimiento de la mano y el temblor fisiológico. Además, los cirujanos se ven obligados de cambiar su campo de visión desde los órganos reales hacia las imágenes fluorescentes son mostradas en un monitor. Todo eso hace que las condiciones de trabajo sean aún más estresantes. Para resolver estos problemas se han utilizado un nuevo dispositivo de imágenes, el sistema de proyección de imágenes médicas (MIPS [Medical Imaging Projection System]), que usa la señal de emisión de verde de indocianina y el mapeo de proyección activa. Dicho dispositivo fue desarrollado en colaboración con Panasonic AVC Networks Company (Osaka, Japón) e incluye un cabezal de proyección y una barra. El cabezal de proyección utiliza un medio espejo para que coincida con el eje óptico de la cámara y el proyector, y se usa durante el procedimiento para obtener la localización del colorante y ajustar la proyección de la imagen para la guía en tiempo real,

independientemente de los cambios y la deformación del órgano. La diferencia entre la ubicación del órgano real y la imagen proyectada está dentro de 1 mm, estando el desfase entre la emisión del VIC fluorescente en el hígado y la imagen proyectada dentro de los 100 ms. El cabezal de proyección está diseñado para ser colocado aproximadamente a 100 cm por encima del campo operatorio y no ser sostenido por el cirujano. La imagen del hígado que se obtiene por las técnicas convencionales como por ejemplo la de 3D, basada en las imágenes preoperatorias de TC tiene cierta desventaja: el hígado se puede mover libremente y cambiar su forma durante la cirugía, haciendo difícil la identificación precisa de la anatomía interna basada en imágenes estáticas. El MIPS supera a los sistemas por imágenes convencionales por las siguientes razones: los cirujanos pueden concentrarse sobre el campo quirúrgico, sin tener que cambiar su visión hacia otros componentes, para visualizar el área de interés (16).

3. Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es el tipo histológico de cáncer de páncreas más común, representando aproximadamente el 90% de los casos. A pesar de presentar una baja incidencia respecto a otros tumores, constituye la séptima causa de muerte por cáncer a nivel mundial, siendo sus tasas de supervivencia a 1 y 5 años del 29% y 7%, respectivamente. La detección temprana de esta patología es la mejor estrategia para mejorar estas cifras. Sin embargo, la ausencia de síntomas específicos y de biomarcadores diagnósticos precisos conduce, en la mayoría de los casos, a su diagnóstico tardío.

✓ Cetuximab (Cetux-800 nm)

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 cuya diana es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Se une al EGFR, bloquea la unión de los ligandos. El EGFR se sobre expresa en el 70% de los carcinomas pancreáticos y en otros tipos de cánceres humanos. Se está investigando la posibilidad de usar el Cetuximab etiquetado con fluorescencia como una sonda para visualizar los tumores pancreáticos y sus metástasis. Se han conjugado Cetuximab con dos colorantes fluorescentes: Alexa Fluor 647 nm y Alexa Fluor 750 nm. El conjugado Cetux-Alexa-750 nm ha sido utilizado como conjugado control. La distribución y la unión del conjugado de Cetuximab Alexa Fluor-647 y el conjugado IgG humano de control co-inyectado se estudiaron durante 48 horas mediante imágenes de fluorescencia infrarrojo cercano obtenidas en ratones con los tumores ortotópicos humanos AsPC-1 y MIA PaCa-2 PDAC. Han podido detectar el complejo Cetux-Alexa-647 nm en ambos tumores pancreáticos presentando la intensidad máxima de fluorescencia a las 24 horas. También el mismo compuesto fue detectado en las metástasis incluso muy pequeñas, alrededor de 1 mm. En ratones con adenocarcinomas ductales pancreáticos el uso de este anticuerpo fluorescente permitió una clara delimitación de los márgenes tumorales y la detección de nódulos invasivos en el estómago, el duodeno y otros órganos. Además, no han detectado los falsos positivos, ya que ni los acinos pancreáticos, ni el epitelio del estómago y el duodeno que rodea el tumor se tiñeron con Cetux-Alexa-647 nm, lo que confirma la especificidad del conjugado para reconocer solo el EGFR humano en células tumorales. (17)

✓ El péptido RGD (cRGD-800 nm-TCO)

La tomografía optoacústica multispectral (MSOT) ilumina el tejido de manera secuencial en diferentes longitudes de onda. MSOT permite obtener las imágenes tridimensionales de una alta resolución espacial y de penetración de hasta 5 cm, por lo que es adecuado para obtener imágenes de tejidos y tumores más profundos. Mediante la combinación del péptido conocido como RGD (nombrado después de los tres aminoácidos que forman la base de este péptido: Arginina-glicina-ácido aspártico) con un fluoróforo, se consigue producir una señal fluorescente detectada por MSOT. Dicho compuesto actualmente está en la fase de estudio clínico. El péptido RGD se dirige a las integrinas, que se expresan en exceso en varios tipos de cáncer y desempeñan un papel clave durante la migración de células tumorales. El péptido cRGD, conjugado con el colorante IRD 800 nm y con una etiqueta de trans-cicloocteno (TCO) se aplicó por la vía intravenosa a los ratones inmunodeficientes con adenocarcinoma ductal pancreático. Previamente a los ratones les hicieron el trasplante de las células AsPC-1 humanas en la cabeza del páncreas. Se tomaron las imágenes con el dispositivo MOST y fluorescencia antes de la inyección del péptido conjugado, a las dos horas después, a las cuatro y seis horas después y por el último al día siguiente. La imagen de fluorescencia de cRGD-800 nm-TCO permitió observar el área del tumor pero sin dar la información sobre su profundidad, mientras que la MSOT permitió la identificación tridimensional del área tumoral, y en particular de pequeños nódulos tumorales. Las imágenes de criposecciones de ratón completo, análisis histopatológico y microscopía fluorescente confirmaron la localización del péptido conjugado en el tejido tumoral. En principio, todas las modalidades de imagen utilizadas pudieron detectar PDAC in vivo. Sin embargo, la combinación de MSOT con péptido conjugado a un grupo fluorescente proporcionó una visión más detallada sobre la distribución y localización del tumor antes y durante la intervención quirúrgica. (18)

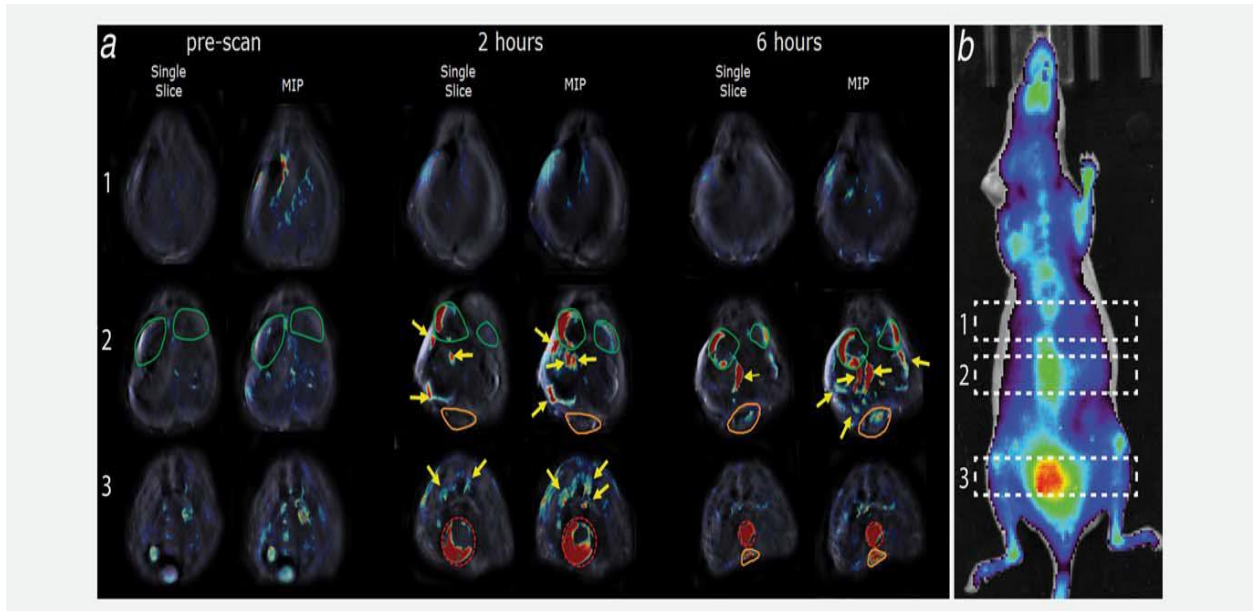


Figura7. Visualización in vivo de AsPC-1-PDAC por MSOT utilizando cRGD-800CW-TCO.

Las flechas amarillas apuntan a los múltiples nódulos diseminados del tumor primario, las líneas naranjas muestran la ubicación de la masa tumoral en la cicatriz quirúrgica, las líneas sólidas muestran la ubicación de los riñones y el rojo punteado de la ubicación de la vejiga.

4. El cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más prevalentes en los países occidentales. La incidencia del CCR varía en función de la edad, incrementándose a partir de los 50 años. Existen numerosos factores dietéticos, del estilo de vida y hereditarios implicados en el desarrollo de CCR. (19) La introducción de la Cirugía citorreductora (SRC) combinada con la quimioterapia (HIPEC) ha contribuido significativamente al aumento de supervivencia de estos pacientes. (20) Se observó una mediana de supervivencia global de 22 meses para los pacientes sometidos a ambas cosas. En comparación con los 13 meses para los pacientes que reciben sólo la quimioterapia sin la cirugía. Hay muchas técnicas para la obtención de imagen como por ejemplo, son la ecografía, tomografía computarizada, imágenes de resonancia magnética (IRM) o tomografía por emisión de positrones (PET). Desafortunadamente, todas estas técnicas son insuficientes para la evaluación preoperatoria de la carga tumoral, o para la determinación de un índice preoperatorio de cáncer peritoneal (ICP). (21)

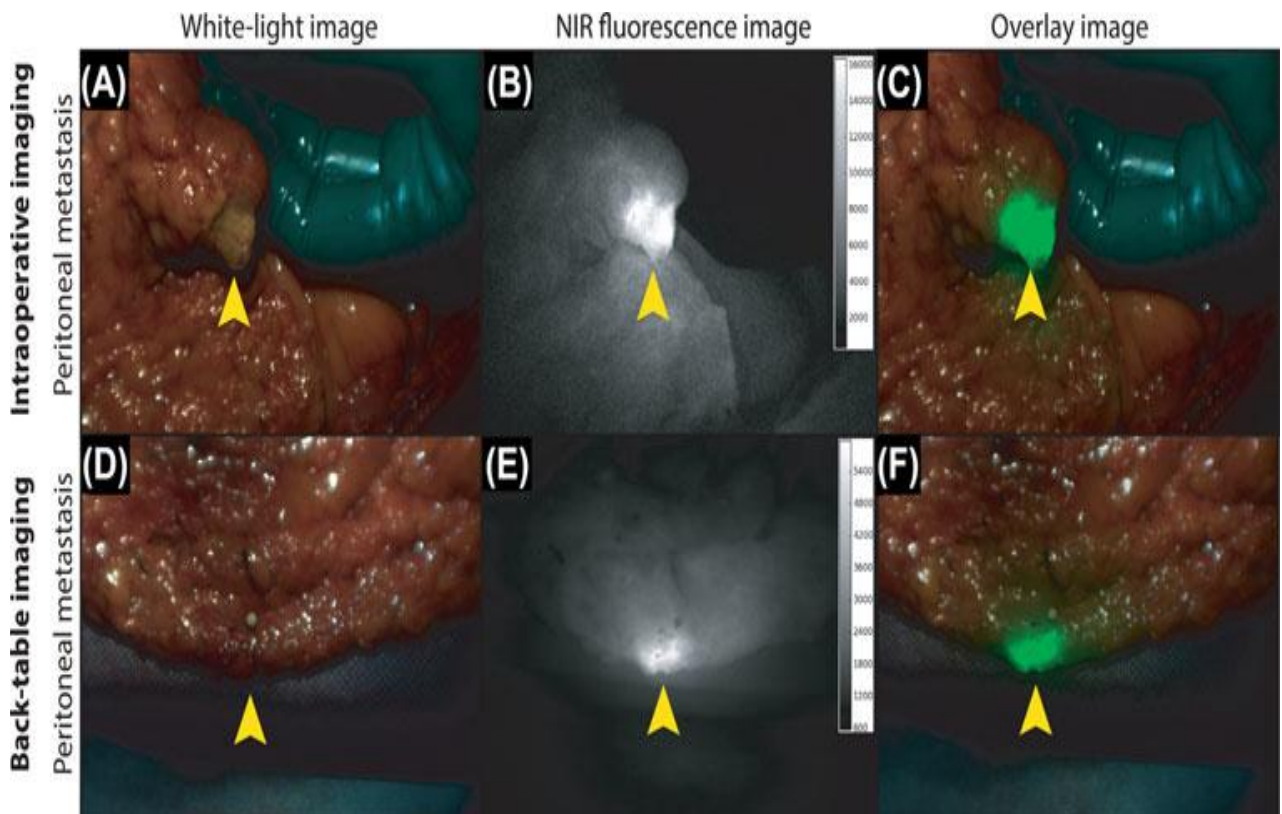


Figura8. Imágenes intraoperatorias con luz blanca, fluorescencia NIR y superposición de ambos. Las imágenes intraoperatorias de un paciente con cáncer colorrectal tras la administración intravenosa de 4,5 mg del trazador fluorescente bevacizumab-800CW dirigido A VEGF-A.

✓ bevacizumab-RD 800 nm

En los últimos años, el uso de marcadores de fluorescencia dirigidos a tumores ha surgido como una técnica de imagen prometedora para orientación de tiempo real en oncología. Bevacizumab es el anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A), inhibiendo la unión a sus receptores. Al neutralizar la actividad biológica se reduce la vascularización del tumor. Dicho anticuerpo monoclonal conjugado al fluoroforo RD

800 nm (bevacizumab-RD 800 nm) fue administrado a los siete pacientes con cáncer colorrectal. Se evaluaron los aspectos de seguridad, así como la captación de trazadores y la delineación del tumor durante la cirugía utilizando un sistema de imagen óptico. Se realizaron análisis histopatológicos para evaluar la biodistribución del marcador tanto en el tejido tumoral como en el tejido sano. Ninguno de los pacientes experimentó eventos adversos. Se observaron señales de fluorescencia en todos los pacientes durante la cirugía. En el análisis histológico realizado tras la cirugía no encontraron tejidos tumorales, por lo que el método empleado presentó una sensibilidad del 100%.

En el otro estudio realizado por Boogerd en 2018 han utilizado otro anticuerpo monoclonal anti-CEA (SGM-101) administrado por la vía intravenosa 2–4 días antes de la cirugía. Los autores del dicho estudio reportan una sensibilidad del 98% y una especificidad del 62%. Ambos marcadores tanto bevacizumab-800CW como SGM-101 fueron considerados seguros. Sin embargo, para determinar de forma fiable la sensibilidad y especificidad se requiere la prolongación de los estudios. (22)

5. Cirugía esofagogástrica

La fuga anastomótica sigue siendo una complicación frecuente y grave en la cirugía gastrointestinal. La tasa media de fuga de una anastomosis gastrointestinal oscila entre un 5-15% para las anastomosis esofágicas. La mortalidad es significativamente mayor en los pacientes que desarrollan una fuga anastomótica. (23) Los estudios anteriores concluyeron que la evaluación de la perfusión con ICG redujo significativamente el riesgo de fuga anastomótica en comparación con los controles históricos sin la evaluación de ICG, la perfusión insuficiente según ICG-FA en el sitio de la anastomosis, o no fugas anastomóticas después de la revisión de perfusión insuficiente. La evaluación intraoperatoria de la perfusión intestinal le brinda al cirujano la oportunidad de individualizar la cirugía y asegurar un suministro de sangre suficiente para la anastomosis. En la práctica clínica, los cirujanos verifican la viabilidad del intestino mediante una inspección general del color intestinal, la pulsación palpable y el sangrado del borde cortado. Sin embargo, esta inspección en muchos casos no les proporciona la información exacta. Por eso se requiere de una herramienta adecuada para evaluar la perfusión intestinal durante la cirugía. Parece ser que el uso de ICG podría ser esta herramienta para objetivar este flujo de sangre a la anastomosis y así poder disminuir la tasa de fuga anastomótica. (24)

Durante la reconstrucción del esófago con un tubo gástrico, el factor más importante para evitar la fuga anastomótica es asegurar que el tubo esté bien perfundido con correcta vascularización. El uso ICG durante la reconstrucción del tubo gástrico puede ayudar a prevenir la necrosis del tubo gástrico. También en las situaciones de urgencia para el diagnóstico de las enfermedades esofagogastroduodenales la valoración intraoperatoria con infusión de ICG intravenoso nos puede ayudar a valorar la viabilidad del contenido herniado, ya que la volvulación puede acarrear consigo zonas isquémicas que muchas veces no se ven bien en la exploración macroscópica. (25)

CONCLUSIONES

- ✓ La mejora de la imagen con fluorescencia puede ayudar a prevenir lesiones inadvertidas durante procedimientos quirúrgicos de estructuras anatómicas críticas.
- ✓ La resección radical de células tumorales mediante navegación guiada por fluorescencia es una técnica relativamente nueva y efectiva que ha sido utilizada en varios tipos de tumores, con una alta tasa de su detección e identificación.
- ✓ La cirugía guiada por fluorescencia no requiere el uso de los dispositivos muy voluminosos y no altera el ritmo habitual del quirófano. Por lo que es rentable económicamente.
- ✓ La actual actividad investigadora está en el desarrollo de sondas fluorescentes cáncer-específicas para la identificación fluoroscópica en tiempo real de tejido tumoral.
- ✓ Aunque se precisan más estudios para aportar mayor evidencia estadística a estos nuevos avances, los resultados actuales son prometedores.
- ✓ Alta sensibilidad de los compuestos fluorescentes, ya que utilizando pequeñas concentraciones pueden hacerse visible al ojo humano.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Ulises Acuña A, Amat-Guerra Francisco, Morcillo Purificación, Benjamín Rodríguez and Marta Liras. Structure and Formation of the Fluorescent Compound of Lignum nephriticum. *Organic Letters*. 2009; 11 (14): 3020–3
- (2) Stokes G, *Phil Trans, Soc.* On the change of refrangibility of light. Lond. 1852; p.463-562, Disponible en: <http://rsl.royalsocietypublishing.org/content/142/463.full.pdf+html>
- (3) Singhal S. The future of surgical oncology: Image-guided cancer surgery. *JAMA Surg.*, 2016; p.184-5. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1001/jamasurg.2015.3604>
- (4) Lakowicz JR. Introduction to fluorescence. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3a ed., USA: Springer; 2006. 1-23.
- (5) Harris D.C. *Análisis químico cuantitativo*. 3a ed., Madrid: Reverté; 1985. p. 420-1.
- (6) Requena Rodríguez A, Zúñiga Román J. *Espectroscopia*. Madrid: Pearson (Prentice Hall); 2004. p. 352-8.
- (7, 8) Engel T, Reid P, *Química Física*. Madrid: Pearson (Addison Wesley); 2006. p.586-7; 959
- (9) Atkins P, de Paula J. *Química Física*. 8a ed., Madrid: Editorial MEDICA PANAMERICANA; 2008. p. 432; 967

- (10) Skood D.A, J.J. Leary. Análisis instrumental, 4ª ed.; Madrid: McGraw-Hill; 1994. p. 201-219
- (11) Morcillo Rubio J, Orza Segade J M. Espectroscopia. Estructura y espectros atómicos. Madrid: Alhambra; 2007. p. 12.
- (12) Boni L, David G, Mangano A, Dionigi G, Spampatti S. Clinical applications of indocyanine green (ICG) enhanced fluorescence in laparoscopic surgery. *Surg Endosc*, 2015; p. 2046-2055
- (13) Kahramangil B, Berber E. The use of near-infrared fluorescence imaging in endocrine surgical procedures. *Surg Oncol*, 2017; p. 848-855
- (14) Kahramangil B, Dip F, Benmiloud F, Falco M, de la Fuente M, Verna S, et al. Detection of parathyroid autofluorescence using near-infrared imaging: A multicenter analysis of concordance between different surgeons. *Ann Surg Oncol*, 2018; p. 957-962
- (15) Zarrinpar A, Dutson E.P, Mobley C, Busuttill R.W, Lewis C.E, Tillou A, et al. Intraoperative laparoscopic near-infrared fluorescence cholangiography to facilitate anatomical identification: When to give indocyanine green and how much. *Surg Innov*, 2016; p. 360-365
- (16) Jian Yang, Hai Su Tao, Wei Cai, Wen Zhu, Dong Zhao, Hao Yu Hu, Jun Liu, Chi Hua Fang. Accuracy of actual resected liver volume in anatomical liver resections guided by 3 dimensional parenchymal staining using fusion indocyanine green fluorescence imaging. *Surg Oncol*, 2018; p. 1081-1087.
- (17) Saccomano M, Dullin C, Alves F, Napp J. Preclinical evaluation of near-infrared (NIR) fluorescently labeled cetuximab as a potential tool for fluorescence-guided surgery. *Int. J. Cancer*, 2016; p. 2277–2289
- (18) Napp J, Stammes A, Claussen J, A.J.M. Prevoo Hendric, Robillard M. S, Vahrmeijer A. L, Devling T, et all. Fluorescence- and multispectral optoacoustic imaging for an optimized detection of deeply located tumors in an orthotopic mouse model of pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2018; p. 2118–2129
- (19) Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015; p. 87–108.
- (20) Yan TD, Chu F, Links M, et al. Cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma: non-mucinous tumour associated with an improved survival. *Eur J Surg Oncol*. 2006; p.1118–1124.
- (21) Koppe MJ, Boerman OC, Oyen WJ, Bleichrodt RP. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies. *Ann surg*. 2006; p.212–222.
- (22) Hentzen Judith E.K.R, Steven J. de Jongh, Hemmer Patrick H.J. Hemmer, Willemijn Y. van der Plas, M. van Dam Gooitzen, Kruijff Schelto. Molecular fluorescence-guided surgery of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: A narrative review. *J Surg Oncol*, 2018; p.332–343.

(23) Díez Ares JÁ, Peris Tomás N, Estellés Vidagany N, Periáñez Gómez D. Gastric necrosis secondary to strangulated giant paraesophageal hiatal hernia. *Esp Enferm*, 2016; p.498-500.

(24) Shimada Y, Okumura T, Nagata T et al. Usefulness of blood supply visualization by indocyanine green fluorescence for reconstruction during esophagectomy. *Esophagus*, 2011; p. 259–266

(25) Familie Liot, Michela Assalino, Nicolas Christian Buchs, Boris Schiltz, Jonathan Douissard, Philippe Morel, Frédéric Ris. Does near-infrared (NIR) fluorescence angiography modify operative strategy during emergency procedures? *Surg Endosc*. 2018; p. 4351–4356.