

ARTÍCULO ORIGINAL

MÉTODO FLUORESCENTE PARA LA DETECCIÓN DE ISQUEMIA MIOCÁRDICA EN TIEMPO REAL EN UN MODELO ANIMAL

ALEJANDRO DAMONTE

GASTÓN QUICHE

FERNANDO DIP

MARCELO DAMONTE

Centro de entrenamiento y Cirugía
Experimental. Hospital de Clínicas
"José de San Martín". Universidad
de Buenos Aires. Argentina

CORRESPONDENCIA:

Alejandro Damonte
Fellow Cirugía Torácica,
"Hospital de Clínicas UBA".
Av. Córdoba 2351, Ciudad:
CABA, Buenos Aires, Argentina.
Tel.: (011)5950-9006.
E mail: aledamon@hotmail.com

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la factibilidad y sensibilidad de un método fluorescente para delimitar un área isquémica miocárdica en tiempo real en un modelo experimental de oclusión coronaria.

Material y métodos: En la Sección de Cirugía Experimental del Hospital de Clínicas "José de San Martín" y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Buenos Aires, se intervinieron 10 conejos New Zealand. Cada individuo fue su propio control. Se les realizaron determinaciones de Troponina, CPK, CPK-mb, LDH, electrocardiograma (ECG), oximetría de pulso y frecuencia cardíaca pre y posoperatorias. Se utilizó anestesia general, y luego de realizar una esternotomía se efectuó la ligadura de la segunda arteria diagonal. Se visualizó la superficie cardíaca con luz de xenón y con luz ultravioleta UV (530 nm) tras la administración de 0,01 mg / kg de fluoresceína sódica al 10%(IV). Los individuos fueron sacrificados y el miocardio evaluado mediante anatomía patológica.

Resultados: Luego de la oclusión coronaria se registraron alteraciones enzimáticas y electrocardiográficas. Se realizó comparación de los valores enzimáticos basales y a los 90 minutos de realizada la isquemia obteniéndose los siguientes resultados: LDH basal vs. LDH posisquemia $159,7 \pm 112,2$ (U/L) vs. $1012 \pm 359,9$ (U/L) ($p < 0,0000781$), CPK basal vs. CPK posisquemia $1,072 \pm 121,7$ (U/L) vs. $359,5 \pm 95,7$ (U/L) ($p < 0,00000002$), CPK mb basal vs. CPK mb posisquemia $0,89 \pm 0,42$ (ng/ml) vs. $3,89 \pm 1,9$ (ng/ml) ($p < 0,00028593$), Troponina basal vs. Troponina posisquemia $0,06 \pm 0,06$ (ng/ml) vs. $19,6 \pm 5,9$ (ng/ml) ($p < 0,00000005$). Los valores de elevación del segmento ST fueron de $1,8 \pm 0,65$ mm en todos los casos. La saturación de oxígeno fue de 97 ± 2 % con una frecuencia cardíaca 145 ± 5 latidos por minuto. Al exponer el área miocárdica injuriada a la luz de xenón, no se visualizaron alteraciones. Sin embargo al ser estimulada la superficie cardíaca con luz de 530 nm se pudo observar un área no fluorescente. Dicha área fue de $0,7225 \pm 0,39$ cm² en la cara anterior del miocardio distal a la oclusión. La injuria miocárdica fue correlacionada por anatomía patológica.

Conclusiones: El método fluorescente utilizado resultó factible y sensible para la evaluación de la vascularización e identificación de un área isquémica miocárdica en tiempo real.

PALABRAS CLAVE: isquemia miocárdica, modelo animal, fluoresceína.

INTRODUCCIÓN

Las propiedades de la fluoresceína sódica son conocidas y utilizadas en medicina desde fines del siglo XIX, sin embargo nunca han sido utilizadas para la evaluación y correlación de un área isquémica miocárdica en tiempo real. La facilidad en su obtención, su rápida distribución en tejidos altamente irrigados como el cardíaco sumadas a su baja tasa de efectos adversos hacen de la misma la sustancia ideal para llevar a cabo dicho trabajo experimental¹.

El objetivo fue evaluar la visualización directa en tiempo real de un área isquémica miocárdica, mediante la utilización de fluoresceína sódica en forma endovenosa bajo estímulo directo con luz UV (530 nanómetros) en un modelo experimental de isquemia miocárdica.

La importancia quirúrgica del reconocimiento correcto del área isquémica, no visualizado con claridad bajo visión directa, radica en:

1. Aportar mayor información sobre la anatomía y la fisiopatología de la enfermedad coronaria in vivo.
2. Mejor visualización del miocardio reperfundido luego de una cirugía de revascularización miocárdica.

Varios autores han realizado diversos modelos experimentales de infarto miocárdico en animales, pero ninguno de ellos evaluó el área con un método fluorescente².

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos fueron realizados en Centro de Cirugía Experimental del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Universidad de Buenos Aires. Durante el año 2013 con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Buenos Aires.

La fluoresceína es una sustancia colorante orgánica hidrosoluble utilizada en angiografía de vasos oculares y en ciertas técnicas

odontológicas. Fue descubierta por el profesor y Premio Nobel de Química (1905) Johann Fiedrich Wilhelm Adolf Baeyer (1835-1917). Se trata de una sustancia hidrosoluble de color amarillo perteneciente al grupo de las xantinas, que produce un color fluorescente verde intenso en soluciones alcalinas (con PH mayor a 7). Cuando se expone a la luz, la fluoresceína absorbe ciertas longitudes de onda y emite luz fluorescente de longitud de onda larga, en este caso cercanas a 530 nm (Figura 1).

Se utilizaron 10 conejos New Zealand (n=10) con un peso promedio de $3,1 \pm 0,6$ Kg.

Cada individuo fue su propio control. Se realizó anestesia general con 35mg/Kg de ketamina y 5mg/Kg xilacina intramuscular como inducción anestésica. Se efectuó rasurado auricular y esternal, colocación de un catéter de 20 G en una vena del pabellón auricular izquierdo. Se confeccionó una traqueostomía lateral asegurando la vía aérea con un tubo endotraqueal n°3. El plano anestésico se mantuvo con un goteo continuo de Propofol. La técnica quirúrgica consistió, previa colocación del individuo en decúbito dorsal con miembros extendidos, en:

1. Esternotomía.
2. Pericardiotomía.
3. Luxación cardíaca.
4. Ligadura de la segunda arteria diagonal con sutura de polipropileno 6,0 utilizando lupas de 3,5 x.

Se visualizó de forma directa el área isquémica con luz de xenón. Posteriormente por vía periférica se inyectó 0,01 mg/kg de fluoresceína sódica al 10% por vía endovenosa. Se alternó la visualización con luz de xenón y luz UV de 530 nm.

Se tomaron muestras de sangre para realizar determinación de enzimas cardíacas (CPK, CPK -mb, LDH y Troponina) pre y posisquemia miocárdica (90 minutos). Se efectuó monitoreo continuo de los animales, registrando valores de saturación de oxígeno, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y electrocardiográficos. Posteriormente se realizaron mediciones del área no fluorescente correlacionable con el área isquémica.

Se practicó eutanasia en todos los animales, el corazón se removió en block y fue remitido a anatomía patológica en formol al 10%.

RESULTADOS

Un total de 10 conejos neozelandeses (n=10) con un peso de $3,100 \pm 0,6$ kg fueron sometidos al modelo experimental de isquemia miocárdica. No se observó mortalidad perioperatoria y se practicó eutanasia en el 100% de los casos a las 2 h de iniciada la inducción anestésica. El ECG, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la oximetría de pulso de todos los individuos inicialmente no evidenciaron alteraciones y fueron tomados como valores basales. Los valores de frecuencia cardíaca evidenciaron valores de 145 ± 5

latidos por minuto, sin variaciones significativas al infarto agudo de miocardio, al igual que la frecuencia respiratoria que fue de 28 ± 5 ventilaciones por minutos. No se observaron cambios significativos en los valores de saturación de oxígeno ($97 \pm 2\%$). La elevación del segmento ST posterior a la ligadura de la segunda arteria diagonal fue inmediata, mostrando un ascenso promedio $1,8 \pm 0,65$ mm.

Los parámetros bioquímicos basales (*tomados en este modelo como normales*) y posligadura coronaria fueron comparados obteniéndose valores de $p < 0,05$ (*utilizando T de Student*) estadísticamente significativos (Tabla 1).

Al exponer el área infartada a luz de xenón y luz UV de 530 nm no se logró visualizar con claridad ni el área ni los límites del sector isquémico (Figura 2).



Figura 2. Ligadura de la segunda arteria diagonal.

NZW conejos	n=10	P
Peso (kg)	$3,10 \pm 0,6$	n/a
ECG		
Anormalidades ECG	Inmediato	n/a
Elevación del ST (mm)	$1,8 \pm 0,65$	n/a
Bioquímica sanguínea		
Troponina (ng/ml) basales	$0,06 \pm 0,06$	n/a
Troponina (ng/ml) posisquemia	$19,6 \pm 5,9$	$<0,0001$
CPK (U/L) basales	$1,072 \pm 121,7$	n/a
CPK (U/L) posisquemia	$359,5 \pm 95,7$	$<0,0001$
CPk –mb (ng/ml) basales	$0,89 \pm 0,42$	n/a
CPk –mb (ng/ml) posisquemia	$3,89 \pm 1,9$	$0,0003$
LDH (U/L) basales	$159,7 \pm 112,2$	n/a
LDH (U/L) posisquemia	$1.012 \pm 359,9$	$<0,0001$
Anatomía patológica		
Tamaño infarto (cm ²)	$0,722 \pm 0,39$	n/a

Tabla 1. Resultados experimentales.

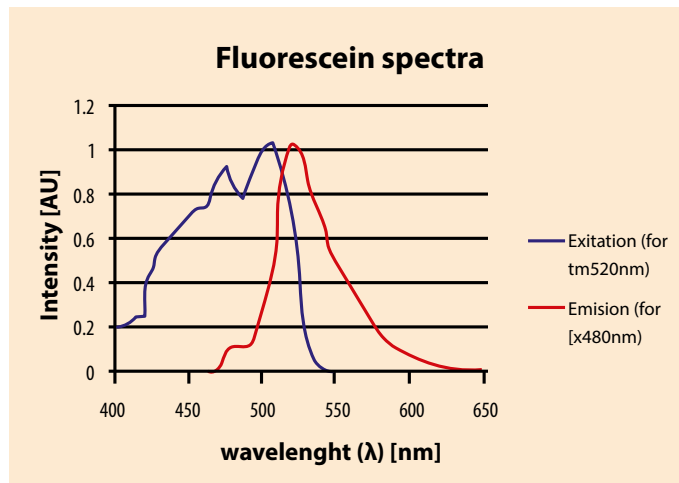


Figura 1. Espectro de la fluoresceína.

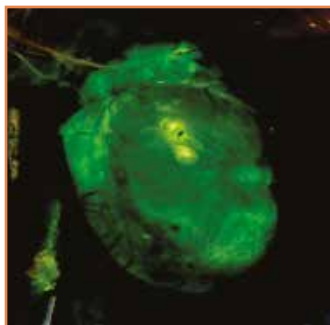


Figura 3. Non-fluorescent area (ischemic).

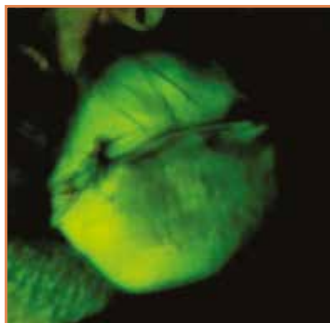


Figura 4. Área no fluorescente (isquémica).



Figura 5. Área no fluorescente (isquémica).

A los 60 segundos de efectuada la ligadura de la segunda arteria diagonal se inyectó por catéter periférico 0,01 ml/kg de fluoresceína sódica al 10%. A la luz de xenón la fluorescencia no se logró identificar con claridad. Sin embargo, al utilizar luz UV de 530 nm se pudo observar que el área vascularizada presentaba una fuerte fluorescencia. En cambio el territorio infartado no mostró fluorescencia delimitándose claramente el área isquémica (Figuras 3, 4, 5 y 6). Se efectuaron mediciones de las mismas y arrojaron valores de $0,722 \pm 0,39 \text{ cm}^2$.

El análisis histopatológico de la pieza quirúrgica demostró hallazgos compatibles con infarto agudo de miocardio, como desorganización de las fibras musculares con mayor eosinofilia y sectores de infiltrado inflamatorio. Vacuolización de citoplasma de miocitos y ondulación de las fibras musculares (Figura 7).

DISCUSIÓN

La anatomía similar a la humana del miocardio del conejo, el fácil acceso al mediastino y un tamaño suficiente de las arterias coronarias fueron los principales motivos para la elección del modelo animal.

Luego de la ligadura de la segunda arteria diagonal coronaria se constató un aumento de las enzimas LDH, CPK, CPK mb, Troponina de manera significativa y cambios electrocardiográficos con la elevación del segmento ST en todos los ejemplares, certificando una isquemia o injuria miocárdica. Kobayashi T. *et al* describen una elevada sensibilidad para la detección de isquemia miocárdica ante la elevación del segmento ST³.

Habitualmente los métodos de determinación del área isquémica afectada son indirectos como el electrocardiograma y la ecocardiografía. El ECG posee también la ventaja de ser un método no invasivo, y su lectura es a través de los cambios eléctricos producidos por el corazón. La ecocardiografía puede determinar

áreas de aquiesia miocárdica y calcular valores que nos orientan sobre la anatomía y geometría ventricular⁴.

La cinecoronariografía por su parte es un método tanto diagnóstico como terapéutico que permite inferir cuál es la arteria coronaria afectada, pero sin embargo no determina el área realmente infartada⁵.

Aún no se han descrito en la literatura técnicas para visualizar durante un procedimiento de revascularización miocárdica a cielo abierto técnicas para delimitar en el intraoperatorio el área isquémica y el comportamiento de tejido miocárdico luego de ser revascularizado⁷⁻⁹.

Este trabajo experimental pone de manifiesto la posibilidad de visualizar en tiempo real el área afectada con la utilización de fluorescencia sódica y luz UV. La fluorescencia es la propiedad de una sustancia que brilla luego de haber absorbido luz u otra forma de energía electromagnética^{1,6}.

Dentro de las sustancias fluorescentes utilizadas en medicina se describen el verde de indocianina con un rango de excitación de 780 nm y de emisión de 830 nm. Esta droga fue utilizada para pruebas de funcionalidad hepática en la antigüedad y actualmente sus propiedades fluorescentes están siendo utilizadas en la visualización de la vía biliar con el objetivo de evitar lesiones quirúrgicas durante colecistectomías laparoscópicas^{6,10}.

El azul de metileno por su parte es utilizado ampliamente en medicina para la evaluación de anastomosis o para el tratamiento de la metahemoglobinemia^{10,13}. Sus propiedades fluorescentes se comenzaron a utilizar recientemente para la visualización ureteral durante cirugías pélvicas¹¹.

En nuestro caso la sustancia utilizada fue la fluoresceína sódica y la fuente de excitación fue la luz ultravioleta con una longitud de onda de 530 nm. En comparación con las otras drogas tiene un rango de excitación menor y posee mayor *quantum* de energía emitida al ser excitada, por lo que la luz emitida es aún mayor¹.

Su peso molecular es de 332,306 g/Mol, lo que impediría su uso para el estudio de linfáticos y ganglio centinela por su tendencia a difundir a los capilares pequeños¹⁴. Justamente esa propiedad es la que consideramos para su utilización en áreas de injuria e infarto.

Para diferenciar la posibilidad de visualización del área infartada a simple vista utilizamos luz blanca. No detectamos áreas de hipoperfusión distal a la arteria ligada como es habitual en los casos de injuria.

Sin embargo luego de la administración de fluoresceína y con la utilización de luz de 530 nm fue posible visualizar, en el 100 % de los casos, la distribución de la fluoresceína en áreas bien vascularizadas y un defecto de relleno (color negro) en áreas no vascularizadas.

Enero - febrero - marzo - abril 2016



Figura 6. Área no fluorescente (isquémica) al corte transversal del corazón.

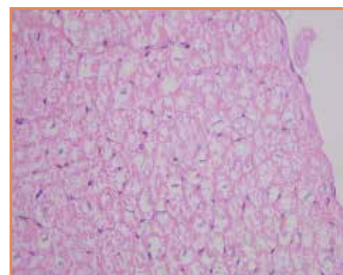
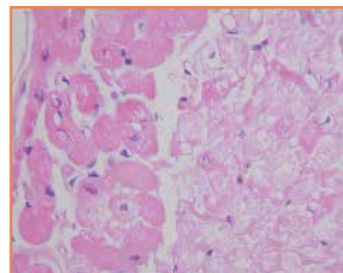


Figura 7. Microscopia. Desorganización de las fibras musculares con mayor eosinofilia y sectores de infiltrado inflamatorio. Vacuolización de citoplasma de miocitos y ondulación de las fibras musculares.

En nuestro caso no fue necesaria la utilización de filtros para la observación de luz como describen Ishizawa *et al* utilizando verde de indocianina, debido a que el campo de emisión de la fluoresceína es visible al ojo humano¹⁵.

Llamativamente el área de fluorescencia se mantuvo incluso luego de sacrificados los animales, lo que interpretamos como un retardo en el lavado del material fluorescente.

No fue accesible la utilización de métodos objetivos de medición de fluorescencia como es el *software* utilizado por Diana *et al* que a manera de sustracción digital le determina con valores el grado de fluorescencia¹⁶.

En nuestro caso la determinación de ausencia o presencia lumínica en el tejido fue llevada a cabo por la interpretación de los autores y comparada con resultados de anatomía patológica coincidiendo en la superficie isquémica y el área no iluminada con fluoresceína.

Este trabajo inicial será útil para el diseño de próximas alternativas de estudio en la evaluación de las consecuencias de la revascularización miocárdica.

CONCLUSIONES

La administración endovenosa de fluoresceína sódica permitió evidenciar con claridad en el 100% de los individuos de esta serie el área isquémica luego de producido un infarto coincidentes con los hallazgos del ECG, enzimáticos y anatomía patológica. ■

Agradecimientos

Dra. Giselle Romero. Servicio de Anatomía Patológica del "Hospital de Clínicas". UBA.
Lic. Paulo Daniel Pascuini. Economista. UBA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valeur, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Vol. 1. Wiley-VCH; 2001.
2. Podesser B. et al. Epicardial branches of the coronary arteries and their distribution in the rabbit heart: the rabbit heart as a model of regional ischemia. *Anat Rec*. 1997; 247: 521-7.
3. Kobayashi T. et al. Electrocardiograms corresponding to the development of myocardial infarction in anesthetized WHHLMI rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), an animal model for familial hypercholesterolemia. *Comp Med*. 2012; 62: 409-18.
4. Jia C., Olafsson R., Kim K., Kolias TJ., Rubin J. M., Weitzel W. F., Witte R. S., Huang S. W., Richards M. S., Deng C. X., O'Donnell M. Two-dimensional strain imaging of controlled rabbit hearts. *Ultrasound Med Biol*. 2009; 35: 1488-501.
5. de Carvalho V. B., Macruz R., Arie S., Martins J. R., Pina R. S., de Oliveira S. A., Pileggi F., Décourt L. V., Zerbini E. de J. Development of coronary atherosclerosis evaluated by cinecoronariography. *Arq Bras Cardiol*. 1980; 34: 431-9.
6. Frangioni J. V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 626-634
7. Soltesz E. G., Laurence R. G., De Grand A. M., Cohn L. H., Mihaljevic T., Frangioni J. V. Image-guided quantification of cardioplegia delivery during cardiac surgery. *Heart Surg Forum* 2007; 10: E381-E386.
8. Taggart D. P., Choudhary B., Anastasiadis K., Abu-Omar Y., Balacumaraswami L., Pigott D. W. Preliminary experience with a novel intraoperative fluorescence imaging

technique to evaluate the patency of bypass grafts in total arterial revascularization. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 870–873.

9. Nakayama A., et al. Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy. *Mol Imaging* 2002; 1: 365–77.

10. De Grand A. M., Frangioni J. V. An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery. *Technol Cancer Res Treat* 2003; 2: 553.

11. Eiichi T. M. D., Shunsuke Ohnishi, Rita G. Laurence, B. Real-Time Intraoperative Ureteral Guidance Using Invisible Near-Infrared Fluorescence. *J Urol*. 2007; 178: 2197–2202.

12. Rangaraj et al. Real-time Visualization and Quantification of Retrograde Cardioplegia Delivery using Near Infrared Fluorescent Imaging. *J. Card Surg*. 2008; 23: 701–708.

13. Nyarangi-Dix J. N., Pahernik S., Bermejo J. L., Prado L., Hohenfellner M. Significance of the intraoperative methylene blue test for postoperative evaluation of the vesicourethral anastomosis. *Adv Urol*. 2012; 2012: 702412.

14. van der Vorst J. R., Schaafsma B. E., Verbeek F. P., Swijnenburg R. J., Hutteman M., Liefers G. J., van de Velde C. J., Frangioni J. V., Vahrmeijer A. L. Dose optimization for near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping in patients with melanoma. *Br J Dermatol*. 2013;168: 93-8.

15. Ishizawa T., Fukushima N., Shibahara J., Masuda K., Tamura S., Aoki T., Hasegawa K., Beck Y., Fukayama M., Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer*. 2009; 115: 2491-504.

16. Diana M., Noll E., Diemunsch P., Dallemagne B., Benahmed M. A., Agnus V., Soler L., Barry B., Namer I. J., Demartines N., Charles A. L., Geny B., Marescaux. Enhanced-Reality Video Fluorescence: A Real-Time Assessment of Intestinal Viability. *Ann Surg*. 2013 Mar 25.