

IDENTIFICACIÓN EN TIEMPO REAL DE LA ANATOMÍA BILIAR MEDIANTE FLUORESCENCIA UTILIZANDO FLUORESCÉINA SÓDICA

SIRIO MELONE (1)
GABRIEL ESCALONA (2)
PEDRO MONSALVE (1)
HERMÓGENES MALAVE (3)
CLAUDIA CARABALLO (4)
JIMMY CASTILLO (5)
MANUEL CAETANO (5)
NELSON ACEVEDO (6)

RESUMEN

Objetivo: Desarrollar, en un modelo experimental animado, la técnica de colangiografía intraoperatoria utilizando fluoresceína sódica. Determinar la dosis de fluoresceína sódica necesaria para obtener la mejor visualización de la vesícula y del árbol biliar. **Método:** Estudio de tipo experimental, en el que se incluyeron 6 conejos albinos de raza Nueva Zelanda, distribuidos en 3 grupos equitativamente, según la dosis de fluoresceína sódica (5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 15 mg/kg). Cumplido el protocolo anestésico, se administró la dosis de fluoresceína sódica según el grupo correspondiente, vía endovenosa. Se realizó una laparotomía por línea media superior, exteriorizándose el hígado y se realizó una maniobra de eversión, para la fácil identificación del sistema biliar extrahepático. Posteriormente, y con los sistema de iluminación, se registraron los parámetros de fluorescencia con cada dosis. No se realizó eutanasia. Ambiente: Centro veterinario privado "Colmillos y garras" **Resultados:** En todos los casos se logró registrar fluorescencia, siendo la dosis que permitió una mejor visualización la de 7,5 mg/kg. El tiempo promedio en el cual se empezó a ver fluorescencia en la vesícula biliar fue de 5 minutos; el tiempo promedio en el cual se alcanzó la totalidad del fenómeno fue de 18 minutos y, en todos los casos, la fluorescencia persistió por 30 minutos. **Conclusión:** La identificación de las vías biliares guiada por fluorescencia, utilizando fluoresceína sódica y con la fuente de luz UV de 5 mm de diámetro diseñada por los autores es factible, siendo la dosis con mejor visualización, la de 7,5 mg /kg de peso.

Palabras clave: Colangiografía - fluorescencia - laparoscopia

- 1 Cirujano general. Adjunto del Servicio de Cirugía II. Hospital Universitario de Caracas
- 2 Cirujano general. Profesor instructor de la Cátedra de Semiología y Terapéutica B. Servicio de Cirugía II. Hospital Universitario de Caracas
- 3 Cirujano general. Profesor Asociado de la Cátedra de Semiología y Terapéutica B. Jefe del Servicio de Cirugía II. Hospital Universitario de Caracas.
- 4 Residente de Cirugía General. Servicio de Cirugía II. Hospital Universitario de Caracas
- 5 Profesor titular de la escuela de Química. Laboratorio de Espectroscopia Laser. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela
- 6 Instructor contratado de la Escuela de Química. Laboratorio de Espectroscopia Laser. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Sirio Melone. Hospital Universitario de Caracas. Servicio de Cirugía II. siriomelone@gmail.com

REAL TIME IDENTIFICATION OF BILIARY ANATOMY BY FLUORESCENCE USING FLUORESCHEIN SODIUM

ABSTRACT

Objective: To develop an experimental animal model technique using sodium fluorescein intraoperative cholangiography. To Determine the dose of sodium fluorescein necessary for the best display of the gallbladder and biliary tree. **Methods:** Experimental study. 6 New Zealand white albino rabbits divided into 3 groups depending on the dose of sodium fluorescein (5 mg / kg, 7.5 mg / kg, 15 mg / kg) were used. Prior anesthetic protocol corresponding fluorescein sodium was administered according included Animal group intravenously. Upper midline incision was used, exteriorization of the liver allow easy identification of extrahepatic biliary system and subsequently illuminated with fluorescence. Parameters were recorded for each dose. No euthanasia was performed. Environment: Private Veterinary Centre "Colmillos y Garras". **Results:** In all cases, we recorded fluorescence. The dose that allowed the best visualization was 7.5 mg / kg. The average time in which fluorescence began to be visible in the gallbladder was 5 minutes, the average time in which the total fluorescence was reached was 18 minutes in all cases fluorescence persisted until 30 minutes. **Conclusion:** Laparoscopic cholecystectomy guided using sodium fluorescein fluorescence and UV light source of 5 mm diameter is feasible. Better visualization is obtained with the dose 7.5 mg / kg.

Keywords: cholangiography - fluorescence - laparoscopy

La colecistectomía laparoscópica es el procedimiento más comúnmente realizado en cirugía general, alcanzando unos 750.000 casos anuales en los Estados Unidos^{1,2}, con una tasa de complicaciones mayores, menor al 3%, constituyéndose en el tratamiento de elección de la litiasis vesicular^{2,3}. De ellas, las lesiones de las vías biliares, cuya frecuencia varía entre el 0,1 al 0,6%⁴, son de manejo complejo y con alta morbimortalidad, afectando la calidad de vida del enfermo^{3,4}. Adicionalmente, este accidente constituye la primera causa de denuncia por dispraxis médica en los cirujanos generales⁵.

El reconocimiento anatómico de las vías biliares, y de sus anomalías asociadas, contribuye en la prevención de estas complicaciones⁵, por lo que se han diseñado procedimientos que facilitan la identificación adecuada de las estructuras del triángulo de Calot, tales como la colangiografía intraoperatoria y el ultrasonido laparoscópico. La primera es la más utilizada, con las desventajas que aumenta el tiempo operatorio y no hay evidencia de que disminuya la incidencia de la lesión iatrogénica de la vía biliar⁶; en tanto que, el ultrasonido laparoscópico tiene los inconvenientes del alto costo y de ser operador-dependiente⁷.

La idea de utilizar colorantes fluorescentes que se concentran en la bilis para mejorar la visualización - en tiempo real - del árbol biliar ha sido desarrollada en estudios recientes^{8,9,10}. En este sentido, la colangiografía por fluorescencia cercana al infrarrojo - o "Near-Infrared Fluorescent Cholangiography (NIRFC) - administrando verde de indocianina (ICG- "indocyanin green") ha sido evaluada en varios modelos animales, así como en colecistectomías, abiertas o laparoscópicas, en humanos¹⁰⁻¹⁴. Entre sus desventajas se encuentran los altos costos, tanto del colorante como del sistema de cámara requerido.

La fluoresceína ha surgido como una alternativa menos costosa. La primera experiencia utilizó una mezcla de fluoresceína sódica con ácidos biliares, la cual se excreta por vía biliar mediante transporte activo, obteniéndose concentraciones biliares altas¹⁵⁻¹⁸. Elbasiouny y col. demostraron que la inyección intravenosa de fluoresceína sódica, y su excitación con luz ultravioleta, facilitó la identificación de la anatomía biliar extrahepática de manera práctica y a menor costo^{18,19}.

Esta inquietud, que busca la forma de identificar mejor, y a menor costo, la anatomía biliar, es el principal motivo que tiene este estudio, cuyo objetivo general es el de desarrollar un modelo experimental animado de la técnica de colangiografía intraoperatoria utilizando fluoresceína sódica. Todo ello tomando, como referencia principal, la experiencia de Elbasiouny y col¹⁹.

MÉTODOS

Para este estudio de tipo experimental, se siguieron las normas bioéticas para la experimentación en animales, establecidas por la Declaración de Helsinki en 1983, y por la guía para el cui-

dado y uso de los animales de laboratorio, del Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, of National Research Council (FDA-USA)⁽²⁰⁾.

La investigación fue aprobada por el Comité de Bioética del Hospital Universitario de Caracas.

Animales

se incluyeron 6 conejos albinos, de raza Nueva Zelanda, con peso entre 2.5 y 3 Kg, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Dr. Rafael Rangel". Se distribuyeron en 3 grupos homogéneos, según la dosis de fluoresceína sódica a utilizar:

- Grupo 1: Constituido por los animales que recibieron la fluoresceína sódica a dosis de 5 mg/kg p.c.
- Grupo 2: Formado por aquellos que recibieron la fluoresceína sódica a dosis de 7,5 mg/kg p.c.
- Grupo 3: Compuesto por los animales que recibieron el colorante a dosis de 15 mg/kg p.c.

Protocolo anestésico

Los animales permanecieron en dieta absoluta en las 6 horas previas al experimento. Se les administró, como antibiótico, Enrofloxacinam a 10 mg/kg de p.c. por vía intramuscular, procediendo a la inducción anestésica. Se repitió la misma dosis a las 12 horas.

La anestesia fue inducida con administración intramuscular de Ketamina, a 10 mg/Kg de p.c., y Xylazina clorhidrato a 6.5 mg/kg p.c. mantenida con Isoflurane. Se realizó monitoreo hemodinámico no invasivo y administración de oxígeno por máscara facial, sin intubación endotraqueal.

Protocolo quirúrgico experimental

La intervención se realizó bajo anestesia general en posición supina y con rasurado del pelo de la región abdominal. Se efectuó antisepsia con iodopovidona y colocación de campo estéril. Se tuvo acceso a la cavidad abdominal a través de una laparotomía media superior. Se exteriorizó el hígado y se evertió para permitir la fácil identificación del sistema biliar extrahepático (Fig. 1). En la vena marginal de la oreja, se administró la dosis de fluoresceína sódica correspondiente, según el grupo al cual fue asignado el animal. Con el campo operatorio totalmente oscuro, se registraron los parámetros del estudio y, posteriormente, se cerró la laparotomía por planos. No se realizó eutanasia.

Fluoresceína

Se utilizó fluoresceína sódica al 10%. Ampolla de 500mg en 5 mL (Ophtalmic TechnologyR).

Sistema de iluminación

Se utilizaron dos sistemas de iluminación: luz de Wood (A) y un sistema de iluminación ultravioleta diseñado por los autores (B) (Fig 2). Las características de ambas fuentes de luz se resumen en la tabla 1.

Para lograr mayor excitación del colorante se requiere de completa oscuridad en el quirófano.



Fig. 1. Exposición del campo operatorio



Fig 2. Sistemas de iluminación utilizados
A: Luz de Wood B. Fuente de luz diseñada por los autores

Tabla 1: Características de las fuentes luminosas empleadas.

	Luz de Wood	Fuente
Longitud de onda (nm)	320-400	405
Intensidad (voltios)	120	3.3-4

Registros

Se registraron los siguientes parámetros:

- Tiempo de aparición de la fluorescencia en el árbol biliar.
- Tiempo de duración de la fluorescencia en el árbol biliar.
- Dosis de fluoresceína sódica necesaria para obtener la mejor visualización del árbol biliar.

RESULTADOS

El protocolo quirúrgico se llevó a cabo en cuatro conejas hembras, sin mortalidad (Tabla 2). Se excluyó un animal de los grupos 1 y 3 debido a que los resultados obtenidos de la primera intervención en cada grupo no justificaba la repetición del protocolo con la dosis utilizada. Con la dosis máxima (15 mg/Kg) la fluorescencia fue excesiva, incluso en el peritoneo, lo que impidió la clara identificación de las estructuras (Fig 4). En el grupo 1, la dosis fue muy baja y no se logró identificar las estructuras adecuadamente.

Tabla 2: Características de la muestra.

Conejo	Grupo	Dosis Fluoresceína (mg/Kg)	Peso (Kg)
1	1	5	2.6
2	2	7.5	2.8
3	2	7.5	2.7
4	3	15	2.9

En todos los casos, se logró registrar la fluorescencia. En el grupo 2 se utilizaron ambas fuentes luminosas, obteniendo la intensidad de emisión de fluorescencia cualitativamente mayor en la fuente de luz diseñada por los autores (B). Sin embargo, la claridad con la que se identificaron las estructuras fue cualitativamente mejor con la luz de Wood. Con la fuente de luz "B" se registró un exceso de brillo que dificultó la visualización.

Se registró fluorescencia en todos los tejidos perfundidos inmediatamente a la inyección de la fluoresceína. El tiempo promedio en el cual se empezó a ver en la vesícula biliar fue de 5 minutos, con un tiempo promedio de 18 minutos para alcanzar la totalidad de la fluorescencia. En todos los casos, la fluorescencia persistió hasta los 30 minutos, tiempo en que se culminó el protocolo quirúrgico (Fig. 3).

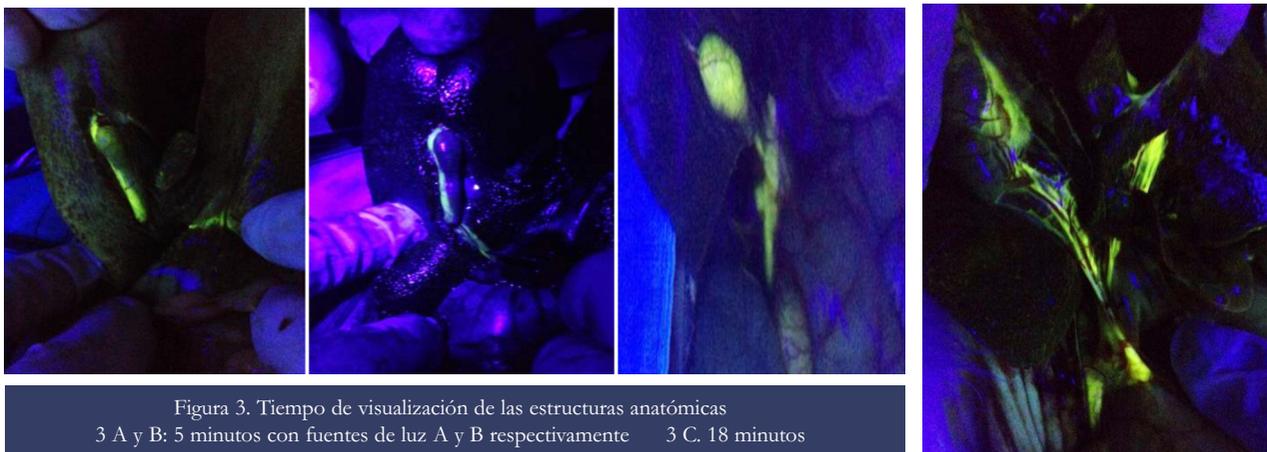


Figura 3. Tiempo de visualización de las estructuras anatómicas
3 A y B: 5 minutos con fuentes de luz A y B respectivamente 3 C. 18 minutos

Fig. 4. No se identifica estructuras por fluorescencia en el peritoneo

DISCUSIÓN

La anatomía de las vías biliares se conoce desde hace 2000 años, cuando fue descrita por los babilonios al diseccionarlas en ovejas, por motivos religiosos. Pero la inquietud de identificarla adecuadamente durante el acto quirúrgico ha sido de gran preocupación para los cirujanos, a lo largo de la historia. Para 1901, Halsted llamaba la atención sobre la necesidad de localizar los cálculos en la luz biliar, clamando por la búsqueda de técnicas que lo permitieran. En 1924, Graham y Cole describen la técnica colangiográfica, sin aceptación por el mundo quirúrgico. No es sino hasta 1931, cuando el argentino Pablo Mirizzi la describe en el Tercer Congreso Argentino de Cirugía, pregonándole como el método que permitía identificar las vías biliares, sus variantes anatómicas y evidenciar sus alteraciones.^{21,22} En Venezuela, y casi simultáneamente, las primeras colangiografías fueron realizadas por el Dr. Rafael Baquero González, en Caracas, y Rafael Urrutia, en Maracaibo.²³

Existen múltiples métodos para evitar lesión de las vías biliares durante la colecistectomía laparoscópica.^{6,7} La fluorescencia brinda imágenes de la anatomía biliar en tiempo real, permitiendo diferenciar las estructuras, incluso antes de lograr su visualización con luz visible. Esto ha sido demostrado en múltiples estudios utilizando ICG, colorante que emite fluorescencia cuando es excitado con un espectro cercano al infrarrojo¹⁰⁻¹⁴. En nuestro estudio logramos obtener las imágenes utilizando luz ultravioleta y fluoresceína sódica sola; sin su unión con los ácidos biliares, como en estudios previos^{15, 16}. La dosis de fluoresceína sódica en conejos varía entre 5 y 15 mg/kg de peso corporal; es por esto que se dividió el estudio en 3 grupos. La dosis con la cual se obtuvo mejores imágenes fue de 7,5 mg/kg, igual a lo reportado por Elbasiouny y Cols¹⁹. Con la dosis máxima (15 mg/Kg) la fluorescencia fue excesiva, incluso en el peritoneo, lo que impidió la clara identificación de las estructuras (Fig 4). En el grupo 1, la dosis fue muy baja y no se logró identificar las estructuras adecuadamente.

El tiempo en el cual se empezó a ver fluorescencia en el árbol biliar en nuestro estudio fue de 5 minutos, similar a lo reportado por Elbasiouny (4,25 minutos). En ambos estudios la fluorescencia persistió hasta los 30 minutos, tiempo en el cual culminó el protocolo quirúrgico experimental.

Las diferencias cualitativas en la calidad de visualización de las estructuras se le atribuye a las fuentes de luz utilizadas (Tabla 3). La luz de Wood ya ha sido utilizada para evaluar fluorescencia en vías biliares¹⁶. En nuestro estudio, la claridad con la que se

identificaron las estructuras fue cualitativamente mejor con la luz de Wood, sin embargo, la intensidad de la fluorescencia fue cualitativamente mayor con la fuente de luz UV fabricada por nosotros.

La colecistectomía laparoscópica guiada por fluorescencia utilizando fluoresceína sódica y la fuente de luz UV de 5 mm de diámetro diseñada por nosotros es factible. Para esto, deberá determinarse si el mayor grosor de la pared de las vías biliares en humanos, así como el tejido adiposo que rodea las estructuras permite la correcta emisión de fluorescencia.

En estudios posteriores, se logrará mejorar la emisión de fluorescencia cambiando la longitud de onda de la fuente, lo cual no fue posible por falta de disponibilidad en el país de LED UV con la longitud de onda deseada.

REFERENCIAS

- Casey B. Duncan and Taylor S. Riall. Evidence-Based Current Surgical Practice: Calculous Gallbladder Disease. *J Gastrointest Surg.* 2012 ; 16(11): 2011-2025.
- Flum D y Col. Bile duct injury during cholecystectomy and survival in medicare beneficiaries. *JAMA* 2003; 290: 2168-2173.
- Navarrete SA, Cantele H, Leyba J, Pérez Y yNavarrelLlopis SA. Colangiografía intraoperatoria por laparoscopiacon catéter de colangiocath y de teflón.Revista de la Facultad de Medicina. RFM v.23 n.2 Caracas jul. 2000.
- Lee VS, Chari RS, Cucchiario G, Meyers WC. Complications of laparoscopic cholecystectomy.*Am J Surg*;165(4):527-32 (1993).
- Wu, Y. V &Linehan, D. C. Bile duct injuries in the era of laparoscopic cholecystectomies. *Surg. Clin. North Am.*90, 787-802 (2010).
- SM Strasberg. Biliary Injury in Laparoscopic Surgery: Part 2. Changing the Culture of Cholecystectomy.*Journal of the American College of Surgeons*, 2005 - journalacs.org.
- Halpin VJ, Dunnegan D, Soper NJ.Laparoscopic intracorporeal ultrasound versus fluoroscopic intraoperative cholangiography: after the learning curve.*Surg. Endosc.* 16: 336-341 (2002).
- Schols, R. M., Bouvy, N. D., van Dam, R. M. & Stassen, L. P. S. Advanced intraoperative imaging methods for laparoscopic anatomy navigation: an overview. *Surg. Endosc.*27, 1851-9 (2013).
- Buddingh, K. T. et al. Intraoperative assessment of biliary anatomy for prevention of bile duct injury: a review of current and future patient safety interventions. *Surg. Endosc.*25, 2449-61 (2011).
- Yoshitomo Ashitate y Col. Real-time Simultaneous Near-Infrared Fluorescence Imaging of Bile Duct and Arterial Anatomy.*Surg Res.* 176(1): 7-13 (2012)
- Figueiredo JLI, Siegel C, Nahrendorf M, Weissleder R. Intraoperative near-infrared fluorescent cholangiography (NIRFC) in mouse models of bile duct injury. *World J Surg.* 34(2):336-43 (2010).
- Matsui A y Col.Real-time intra-operative near-infrared fluorescence identification of the extrahepatic bile ducts using clinically available contrast agents.*Surgery.*148(1):87-95 (2010)
- Tagaya, N. Y Col. Intraoperative exploration of biliary anatomy using fluorescence imaging of indocyanine green in experimental and cli-

Tabla 3: Comparación de las fuentes de luz

	Luz de Wood	Nuestra fuente	Elbasiouny
Longitud de onda (nm)	320-400	405	492

- nical cholecystectomies. *J. Hepatobiliary Pancreat.Sci.* 17, 595-600 (2010).
14. Aoki T y col. Intraoperative fluorescent imaging using indocyanine green for liver mapping and cholangiography. *J HepatobiliaryPancreat Sci.* 17(5):590-4 (2010).
 15. Holzinger F y Col. Use of a fluorescent bile acid to enhance visualization of the biliary tract and bile leaks during laparoscopic surgery in rabbits. *SurgEndosc* 15:209-212 (2001)
 16. Oddi A y Col. Intraoperative biliary tree imaging with cholyl-lysyl-fluorescein: an experimental study in the rabbit. *SurgLaparoscEndosc.* 6:198-200 (1996).
 17. Romanchuk K. Fluorescein. Physicochemical Factors Affecting Its Fluorescence. *Survey of ophthalmology.* 26 (5) 256-262 (1992)
 18. Wakabayashi, H., Shinzawa, H., Toda, H., Takahashi, T. & Ishikawa, M. Fundamental and clinical studies on fluorescence laparoscopy after intravenous injection of fluorescein-sodium. *Gastroenterol.Jpn.* 24, 676-84 (1989).
 19. Elbasiouny, M. S. Light Emitting Diode and Fluorescein Dye can be Used to Enhance Visualization of Extrahepatic Biliary Ducts .An Experimental Study. 77-82 (2009).
 - 20) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council National Academy Press Washington, D.C. 1996
 - 21) Quintero, G: Cirugía hepatobiliar Historia y perspectiva Historia y Perspectiva Disponible en Wide World encolombia.com/medicina/academ/academ26467-hepatobiliar.htm
 - 22) Manrique L; P: La cirugía biliar en Venezuela *Gac Med de Caracas* 1985 12(10-12) 449-87 6)
 - 23) Baquero; R: Estado actual de la cirugía biliar en Venezuela *Memorias del Primer Congreso Venezolano de Cirugía Edit Sucre* 33-75 1951