

# Novedoso agente multimodal combinando fluorescencia y radiactividad para la detección de ganglios linfáticos

María Jimena Salgueiro<sup>1</sup>, Mariano Portillo<sup>2</sup>, Silvia Vanzulli<sup>3</sup>, Lucas Colombo<sup>4</sup>, Marcela Zubillaga<sup>5</sup>, Marcela Analía Moretton<sup>6</sup>, Cristina Zarlenga<sup>7</sup>.

1 - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Fisicomatemática, Cátedra de Física..

2 - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Fisicomatemática, Cátedra de Física..

3 - Academia Nacional de Medicina. Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA), Departamento de Patología. / Universidad de Buenos Aires, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Centro Oncológico de Medicina Nuclear (CNEA-UBA)..

4 - Universidad de Buenos Aires, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Área de investigación. / CONICET..

5 - Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Fisicomatemática, Cátedra de Física. / CONICET..

6 - CONICET. / Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Tecnología Farmacéutica, Cátedra de Tecnología Farmacéutica I..

7 - Universidad de Buenos Aires, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, Centro Oncológico de Medicina Nuclear (CNEA-UBA), Buenos Aires, Argentina..

## Resumen

**Objetivo:** Desarrollar un agente multimodal basado en <sup>99m</sup>Tc-nanocoloide y verde de indocianina (ICG) para el mapeo de ganglios linfáticos (GL) y potencial aplicación en biopsia de ganglio centinela (GC).

**Materiales y métodos:** Se estudiaron las diluciones óptimas de ICG y nanocoloide radiomarcadas con <sup>99m</sup>Tc (método directo). Se realizó la caracterización nano-radiofarmacéutica del agente multimodal y se estudió el comportamiento biológico in vivo en ratas. Se adquirieron imágenes tempranas y tardías tanto radioisotópicas (preoperatorias) dinámicas y estáticas con cámara gamma, como fluorescentes (intraoperatorias) con detector de fluorescencia portátil. Los GL fueron extirpados y reservados para análisis histológico confirmatorio.

**Resultados:** La co-localización de las señales fluorescente y radioisotópica, fue confirmada biológicamente y posteriormente por análisis histológico.

**Conclusión:** Este novedoso agente permitió la detección de los GL mediante doble modalidad de imágenes, convirtiéndolo en un candidato potencial eficaz para la biopsia de GC.

**Palabras clave:** Ganglio centinela, verde de indocianina, <sup>99m</sup>Tc-radiocoloide, agente imagenológico multimodal.

## Abstract

**Objective:** To develop a multimodal agent based on <sup>99m</sup>Tc-nanocolloid and indocyanine green (ICG) for lymph node (LN) mapping and potential application in sentinel node biopsy (SNB).

**Materials and methods:** The optimal dilutions of ICG and nanocolloid radiolabeled with <sup>99m</sup>Tc (direct method) were studied. The nano-radiopharmaceutical characterization of the multimodal agent was performed and the biological behavior was studied in vivo in rats. Early and late radioisotopic images (preoperative) were acquired in dynamic and static mode with a gamma camera, and fluorescent images (intraoperative) with a portable fluorescence detector. The LN were excised and reserved for confirmatory histological analysis.

**Results:** The co-location of the fluorescent and radioisotopic signals was confirmed biologically and later by histological analysis.

**Conclusion:** This novel multimodal agent improved the detection of LN by imaging modality, making it a potential effective candidate for SNB.

**Key words:** Sentinel node, indocyanine green, <sup>99m</sup>Tc-radiocolloid, multimodal imaging agent.

## Introducción

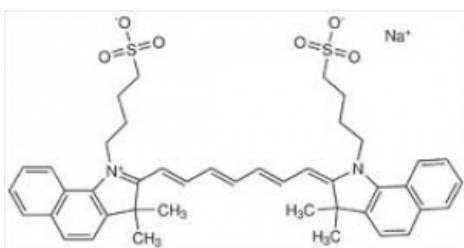
Uno de los mayores desafíos en cirugía oncológica es la detección intra-operatoria de lesiones diagnosticadas en la etapa pre-operatoria. Un ejemplo de lo mencionado es la detección combinada pre e intra-operatoria del ganglio centinela (GC). El GC es el ganglio que recibe el drenaje linfático directamente desde el tumor primario y por lo tanto, es el primero en recibir células metastásicas<sup>(1,2)</sup>. El GC es detectable mediante la linfogammagrafía, especialmente si es posible visualizar el respectivo canal linfático y el procedimiento tiene como objetivo localizar, extirpar y examinar el GC. Su importancia radica en que permite la estadificación de los pacientes mediante una cirugía mínimamente invasiva y con menor morbilidad que una linfadenectomía<sup>(1,2)</sup>. Actualmente, su uso es frecuente en el carcinoma de mama, el melanoma y el carcinoma de pene, vulva y cavidad oral, entre otros<sup>(3)</sup>.

El procedimiento de linfogammagrafía se realiza habitualmente en el servicio de medicina nuclear entre 18 a 24 hs antes de la cirugía para biopsia de GC. Consiste en la inyección de un coloide marcado con Tecnecio-99m (<sup>99m</sup>Tc) en las cercanías del tumor, la adquisición de imágenes centellográficas dinámicas y/o estáticas post-administración y, cuando es posible, la marcación en piel de la proyección ganglionar para facilitar la ubicación del GC. Una vez en el quirófano, se realiza la cirugía radioguiada en la que primeramente se corrobora la ubicación del GC utilizando instrumental portátil (sonda intra-operatoria o "gamma probe", a veces una cámara gamma especial). Como alternativa, también se puede realizar la inyección de colorante vital (azul de metileno o azul patente) en el tumor 15 minutos antes de cirugía para lograr la visualización directa del canalículo linfático y el GC teñidos, que son posteriormente extraídos para su análisis histopatológico<sup>(1,2)</sup>. Estos procedimientos presentan ventajas y desventajas relativas (Tabla 1), asociadas a la intensidad y estabilidad de la señal que emite cada uno de estos trazadores (óptica visible vs. radiactiva), sus características químicas, su estabilidad y su comportamiento biológico, entre otras.

**Tabla 1:** Diagnóstico de anatomía patológica según frecuencia en pacientes con biopsia.

Trtazador	Ventajas	Desventajas
<sup>99m</sup> Tc-radiocoloide	Imágenes pre-quirúrgicas e intra-quirúrgicas Señal acústica Permite la valoración del lecho quirúrgico	Accesibilidad limitada No visualización óptica Difícil detección entre GC y sitio de inyección si son cercanos
<sup>99m</sup> Tc-radiocoloide + Colorante	Aumento de la probabilidad de detección Rápida identificación del GC a través de la visualización de sus vasos linfáticos aferentes intra-quirúrgico	Necrosis Tisular Rápida difusión Pigmenta la piel Afectar la visualización del campo quirúrgico Reacciones anafilácticas

Con el objetivo de mejorar la localización visual del GC, desde hace algunos años se ha introducido el uso de trazadores fluorescentes para la cirugía radioguiada, ya que ofrece la posibilidad de obtener la imagen en tiempo real del GC sin afectar el campo quirúrgico<sup>(4-6)</sup>. El trazador más utilizado es el verde de indocianina (ICG) (fig. 1), un agente fluorescente cuya señal se emite en el infrarrojo cercano (NIR) y se encuentra aprobado por la agencia reguladora sanitaria de los Estados Unidos (FDA)<sup>(7)</sup>.



**Figura 1** Estructura química del verde de indocianina (ICG).

Algunos autores europeos han reportado resultados sobre la utilización de <sup>99m</sup>Tc-nanocoloide de albúmina en conjunto con la ICG en un tipo de "cocktail", sugiriendo la formación de un agente híbrido<sup>(8-11)</sup>. Asimismo, la utilización de <sup>99m</sup>Tc-fitato e ICG también ha sido investigada en un escenario preclínico para su utilización como agente híbrido en la biopsia de GC en tumores de la cavidad oral<sup>(12)</sup>. Sobre la base de estas experiencias previas, teniendo en cuenta la capacidad de la ICG de unirse a proteínas<sup>(13)</sup> y la reciente disponibilidad de equipamiento detector de fluorescencia portátil, decidimos desarrollar un método que combinara las modalidades óptica (NIR) y radioisotópica para detección de ganglios linfáticos (GL) y describir su aplicación en animales de experimentación con vistas a su utilización clínica.

# Materiales y métodos

## Elaboración del agente multimodal para imágenes

Se diluyeron 25 mg de ICG en 10 mL de solución fisiológica (2,5mg/mL); a partir de la misma, se prepararon diluciones 1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000. Por otra parte, se diluyó un frasco conteniendo 7,5 mg de gelatina de colágeno bovino (GCB; Linfast, Laboratorios Bacon SAIC, Argentina) en 4 mL de solución fisiológica (1,88 mg/mL). En frascos independientes, se colocó 1 mL de cada dilución de ICG y 1 mL del coloide de GCB. Finalmente, a cada frasco se agregó 814 MBq (22,2 mCi) de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  en un volumen de 1 mL, eluído a partir de un generador  $^{99}\text{Mo}$ - $^{99m}\text{Tc}$  (Laboratorios Bacon SAIC, Argentina); el volumen final de cada vial resultó de 3 mL. La Tabla 2 muestra el resumen de las preparaciones multimodales preliminares obtenidas según la proporción de la dilución de ICG y el coloide preformado para conformar el agente híbrido.

**Tabla 2: Proporciones de dilución de ICG, coloide preformado y  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  para la conformación del agente híbrido.**

Composición de las preparaciones multimodales preliminares						
Frasco	Dilución ICG	ICG alícuota	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ -alícuota/actividad	GCB alícuota	Volumen final	Concentración final ICG/actividad
1	1/10	1mL	1mL / 814 MBq	1mL	3mL	83,33 ug/mL / 271 MBq/mL
2	1/100	1mL	1mL / 814 MBq	1mL	3mL	8,33 ug/mL / 271 MBq/mL
3	1/1000	1mL	1mL / 814 MBq	1mL	3mL	0,83 ug/mL / 271 MBq/mL
4	1/10000	1mL	1mL / 814 MBq	1mL	3mL	0,083 ug/mL / 271 MBq/mL

## Caracterización nanotecnológica y radioquímica del agente multimodal

La caracterización del tamaño de partícula del agente multimodal, su distribución y su morfología se realizó mediante mediciones del diámetro hidrodinámico promedio y su distribución, empleando el método de dispersión dinámica de la luz (DLS; Zetaziser Nano-ZSP, ZEN5600, ángulo de dispersión  $\theta = 173^\circ$ , Malvern Instruments, UK) y microscopía electrónica de transmisión (TEM; Philips CM-12 TEM apparatus, FEI Company, The Netherlands). Las muestras (1 mL) se analizaron por triplicado y fueron equilibradas a la temperatura de análisis (25°C y 37°C) durante 5 minutos antes de cada determinación. Estos ensayos se realizaron de forma comparativa con aquellos en los que se caracterizó el  $^{99m}\text{Tc}$ -radiocoloide empleado en las formulaciones. Asimismo, se ensayaron los mismos parámetros descriptos anteriormente para preparaciones realizadas a partir de fracciones conservadas por congelamiento de los precursores no radiactivos de la formulación. Para los ensayos en DLS, las muestras (1 mL) fueron medidas de forma directa sin preparación, mientras que para la medición en TEM se realizó la tinción con una solución de ácido fosfotúngstico al 1% p/v.

La eficiencia de la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  fue determinada mediante cromatografía ascendente utilizando ITLC (Varian, USA) como fase estacionaria y metil-etil-cetona como fase móvil. En este sistema, el  $R_f$  del  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre es de alrededor de 0,9-1,0 mientras que para las impurezas radiocoloidales el  $R_f = 0$ . Se espera que el agente multimodal de naturaleza nanoparticulada presente también  $R_f = 0$ , por similitud en su estructura radioquímica con el radiocoloide original. Por otro lado, para comprobar que la preparación resulta en un agente multimodal verdadero y diferenciarla de las impurezas radiocoloidales, se realizó una cromatografía ascendente utilizando ITLC como fase estacionaria y una mezcla de piridina:ácido acético:agua (3:5:1,5) como fase móvil<sup>(14)</sup>. Este sistema permite la separación de las impurezas radiocoloidales, ya que presentan  $R_f = 0$ , mientras que los sistemas nanoparticulados migran con  $R_f = 0,5-1,0$ .

## Estudios in vivo en animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley (peso corporal  $195 \pm 12$  g; Bioterio Central, Fac. de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) que fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable en la sala de animales, acondicionada a temperatura de 22-23°C con humedad cercana al 56% y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL; Res (D) N°671/18) de la Fac. de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

## Administración de las preparaciones

La administración de las distintas preparaciones del agente multimodal o del  $^{99m}\text{Tc}$ -GCB utilizado con fines comparativos, se realizó mediante la inyección de habones subdérmicos en los miembros inferiores de las ratas, bajo anestesia con isofluorano 2% utilizando oxígeno como vehículo, de modo de lograr su inmovilización durante todo el procedimiento, incluyendo la adquisición de imágenes.

## Selección del volumen de administración y dilución del agente multimodal

Para el ensayo de selección de la preparación del agente multimodal y ajuste del volumen de inyección, se comenzó por la administración de las formulaciones más concentradas descritas en la Tabla 2, de manera de evaluar el efecto del “quenching” in vivo. Las formulaciones se administraron de acuerdo con el siguiente esquema: pata derecha 0,1 mL del agente multimodal (para la dilución 1/10 corresponde a 8,33 µg ICG y para la dilución 1/100 corresponde a 0,83 µg ICG, conteniendo 81,4 MBq en ambos casos) y pata izquierda 0,05 mL del agente híbrido (para la dilución 1/10 corresponde a 4,16 µg ICG y para la dilución 1/100 corresponde a 0,41 µg ICG, conteniendo 40,7 MBq en ambos casos). En base a los resultados y una vez seleccionada la preparación multimodal definitiva, las administraciones se realizaron según el mismo procedimiento descrito en el ítem anterior.

## Caracterización del comportamiento biológico del <sup>99m</sup>Tc-GCB y del agente multimodal

Luego de la administración del <sup>99m</sup>Tc-GCB o del agente multimodal, según el protocolo correspondiente, los animales fueron posicionados en una cámara gamma (Ohio Nuclear, Alfanuclear) de campo chico equipada con colimador de alta resolución para la adquisición de imágenes centellográficas pre-operatorias, continuando bajo el efecto de la anestesia. Estas imágenes fueron adquiridas según protocolo dinámico inmediatamente luego de la administración hasta los 30 min; posteriormente se obtuvieron imágenes estáticas a diferentes tiempos y hasta las 24 hs, según se evaluara la distribución del <sup>99m</sup>Tc-GCB o del agente multimodal. Las imágenes fueron procesadas utilizando software dedicado para animales de laboratorio (IM512, Alfanuclear, Argentina) a fin de realizar semicuantificaciones a partir de la selección de áreas de interés y construcción de curvas de actividad en función del tiempo.

Para validar la caracterización del comportamiento biológico del agente multimodal según lo observado en las imágenes radioisotópicas, los animales fueron trasladados al quirófano donde se practicó su eutanasia y la posterior identificación intra-operatoria de GL mediante una cámara portátil de fluorescencia (Laboratorios Bacon SAIC, Argentina) empleando luz de excitación de 745 nm y filtros detectores de 820 nm (fig. 2). El detector portátil se encuentra acoplado a un ordenador equipado con software para la reproducción y captura de imágenes estáticas y en modo cine. La validación intra-operatoria de la distribución biológica del agente multimodal fue realizada a 1 h y 24 hs post-administración.

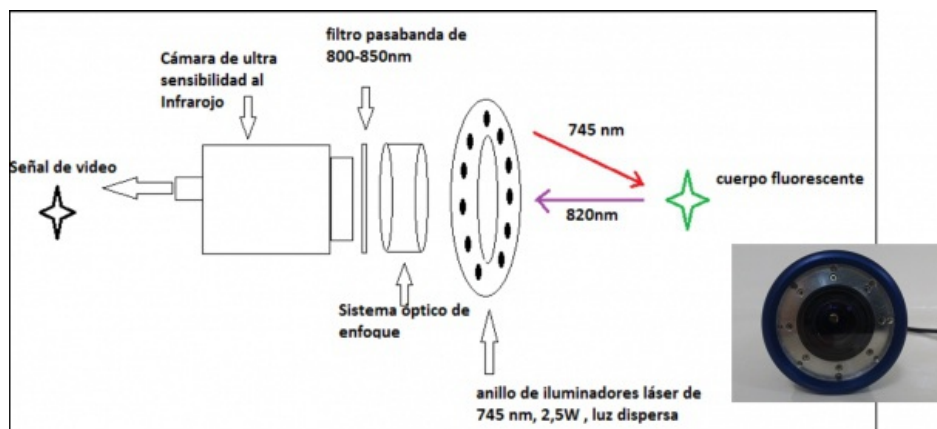


Figura 2 Esquema de la cámara portátil para detección de fluorescencia.

## Estudio histopatológico

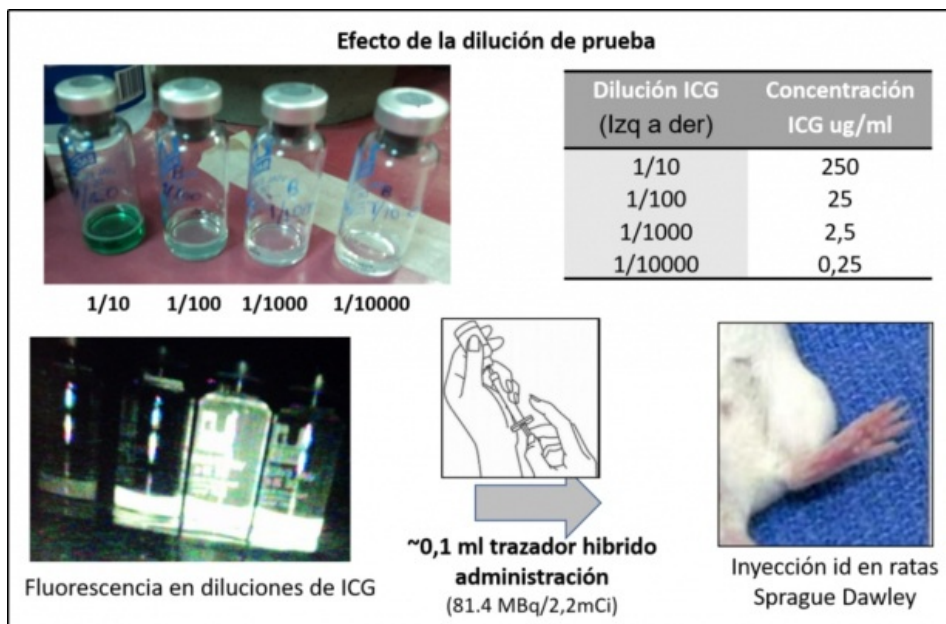
Los GL extraídos en los procedimientos quirúrgicos fueron procesados para análisis histopatológico de confirmación de tejido ganglionar por inclusión en parafina, corte y posterior tinción con hematoxilina-eosina. El análisis de los preparados se realizó mediante microscopio óptico (Axiolab Carl Zeiss, Göttingen, Germany) acoplado a una cámara fotográfica (Canon PowerShot G5, Japón), que permitió la documentación de los resultados.

## Resultados y discusión

### Elaboración y caracterización nanotecnológica y radioquímica del agente multimodal

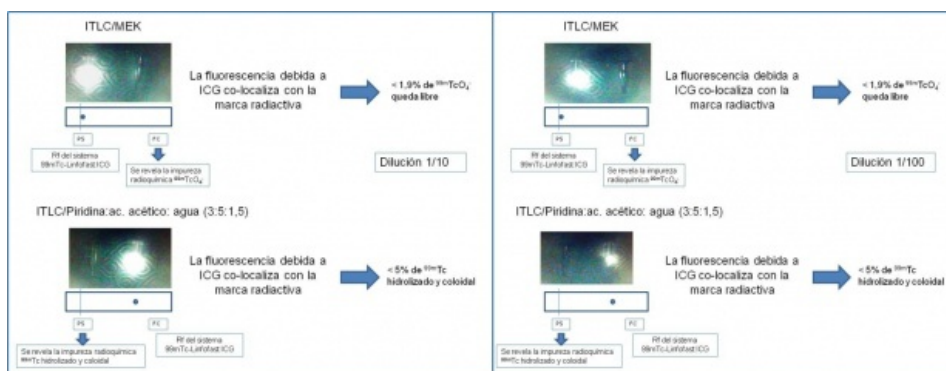
La elaboración del agente multimodal se realizó a partir de 4 preparaciones preliminares, de acuerdo con la combinación de los componentes descritos en la Tabla 2, que difieren en el aporte de ICG para cada una de las opciones, la cual se agrega a cada

una de las preparaciones a partir de una dilución de la solución madre. La dilución de la ICG es necesaria debido al efecto de “quenching” que puede surgir a altas concentraciones del agente fluorescente y que interferirá con la detección de la señal (fig. 3). Este efecto debe tenerse en cuenta para seleccionar la dilución de ICG que no produzca “quenching” in vivo, pero que conserve suficiente intensidad de señal en relación al fondo cuando la preparación es fraccionada para ser administrada a los animales de experimentación. Los resultados de estas pruebas mostraron que en las diluciones 1/10 y 1/100 se produce “quenching” in vitro. Sin embargo, teniendo en cuenta que las mismas serán utilizadas en la preparación del agente resultando en dilución 1/3 y que posteriormente se administrará 0,1 mL como volumen máximo en el miembro a evaluar en las ratas (dilución in vivo), igualmente fueron las diluciones seleccionadas para los ensayos de caracterización in vitro e in vivo.



**Figura 3** Ensayos para evaluar el efecto de la dilución de prueba en la aparición de “quenching”. En las imágenes obtenidas con cámara detectora de fluorescencia se observa el “quenching” en la dilución 1/10 y la visualización de fluorescencia aparece y se incrementa desde la dilución 1/100 hacia la 1/10000.

La caracterización radioquímica del agente multimodal mostró la co-localización de la señal fluorescente debido a la ICG y de la señal radiactiva debido al  $^{99m}\text{Tc}$ , presentes en su composición, cuando se realizó el revelado de los sistemas cromatográficos para evidenciar posibles impurezas resultantes de su elaboración. Adicionalmente, se comprobó que el agente multimodal pudo separarse de las impurezas radioquímicas resultantes de las marcaciones con  $^{99m}\text{Tc}$  en general (el  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) y de aquellas que utilizan cloruro estañoso como agente reductor, como en este caso particular (el  $^{99m}\text{Tc}$ -hidrolizado o coloidal). La eficiencia de marcación del agente multimodal resultó superior al 90% en todos los ensayos realizados; este resultado es compatible con las especificaciones de calidad que en general cumplen los agentes para imágenes radioisotópicas. La figura 4 muestra un esquema representativo del ensayo descrito; ambas diluciones de ICG seleccionadas anteriormente (1/10 y 1/100) alcanzaron resultados satisfactorios y por tanto fueron empleadas en los estudios in vivo.



**Figura 4** Caracterización radioquímica del agente multimodal.

La caracterización nanotecnológica del agente multimodal se realizó analizando el tamaño y forma de las partículas coloidales mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y por dispersión dinámica de la luz (DLS). En primer lugar, se obtuvieron datos acerca del nanocoloide original ( $^{99m}\text{Tc}$ -GCB) ya que su preparación se realizó en condiciones diferentes a las sugeridas

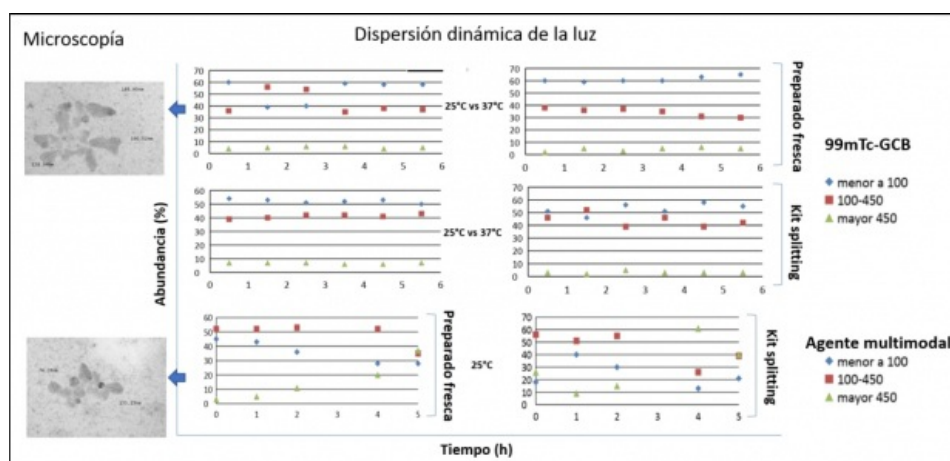
por el fabricante. En este sentido, se analizó la distribución del tamaño de partícula a 25°C simulando la temperatura ambiente de preparación y a 37°C simulando la temperatura corporal de los animales de experimentación. Por otra parte, debido a que el juego de reactivos así utilizado posee tres fracciones similares remanentes luego de la reconstitución, se estudió la distribución del tamaño de partícula de dichas fracciones luego de su congelamiento por 7 días y posterior descongelamiento para la preparación del agente. Esta práctica se denomina “kit splitting” y permite un mayor aprovechamiento del juego de reactivos, en tanto se validen sus características de calidad en la situación de empleo<sup>(15)</sup>.

En el caso del <sup>99m</sup>Tc-GCB, se observaron diferentes poblaciones de tamaño; el 52% de las partículas presentaron tamaños < 100 nm, el 43% entre 100-450 nm y solo el 5% > 450 nm (fig. 5). Estos valores se mantienen relativamente constantes hasta 6 hs luego de la elaboración, indicando que no existe agregación del coloide y que el sistema es estable con estas condiciones de preparación y a temperatura ambiente. Estos resultados avalan el uso del producto reconstituido de esta forma ya que, aunque no responde a lo especificado en las instrucciones del proveedor, la distribución de tamaños se corresponde con la habitual para radiofármacos empleados en biopsia de GC. Según la bibliografía, partículas < 4-5 nm penetran en capilares y no migran a linfáticos; las partículas entre 10-100 nm son las que desaparecen rápidamente del espacio intersticial y se acumulan en ganglios linfáticos; y las partículas > 500 nm presentan muy baja velocidad de migración, permaneciendo más tiempo alrededor del punto de inyección y más tarde son retenidas en el primer ganglio del circuito. Dado que el ensayo realizado a 37°C (fig. 5) simulando la temperatura corporal no muestra variaciones significativas en el tamaño de partícula ni en su distribución, su comportamiento in vivo sería predecible según este parámetro.

Cabe destacar que el “kit splitting” realizado con el juego de reactivos para preparar el nanocoloide no afectó el tamaño de partícula así como tampoco su distribución a temperatura ambiente o en simulación de temperatura corporal, cuando las fracciones remanentes permanecieron congeladas a -20°C durante 7 días y bajo estas condiciones de elaboración. En el caso de la fracción descongelada y evaluada a 25°C, el 52% de las partículas midió < 100 nm, el 6% (±1) > 450 nm y solo el 41% (±1) se encontraba entre 100-450 nm. Para el caso de la fracción evaluada a 37°C, el 53% de las partículas fue < 100 nm, el 44% entre 100-450 nm y solo el 3% > 450 nm.

En base a estos datos, se procedió a caracterizar la distribución de tamaño de un preparado fresco del agente multimodal elaborado con <sup>99m</sup>Tc-GCB y con ICG. Los resultados mostraron que a 25°C se observa una población heterogénea en tamaño de partícula, con una distribución estable dentro de las primeras 2 hs de preparación. A partir de la tercera hora se observan fenómenos de agregación, resultando en un incremento de las poblaciones con tamaño de partícula > 450 nm y una disminución marcada de las partículas < 100 nm. Sin embargo, no se observan variaciones en el porcentaje de partículas en el rango de 100-450 nm durante las primeras 4 hs de preparado el producto. En el caso en que la preparación se realiza a partir de una fracción descongelada proveniente del “kit splitting”, estos resultados muestran ciertas variantes, con la repetición de fenómenos de agregación de partículas pequeñas para incrementar la presencia de partículas > 450 nm y, para el caso de aquellas comprendidas entre 100-450 nm, presencia estable hasta 2 hs luego de preparado.

En conjunto, estos resultados permiten determinar que el agente multimodal posee características nano-radiofarmacéuticas similares al radiofármaco coloidal de referencia y puede ser utilizado dentro de las 4 hs luego de preparado a partir de un juego de reactivos fresco, o hasta 2 hs a partir de una fracción congelada, conservando su distribución de tamaño de partícula compatible con la sugerida para biopsias de GC.

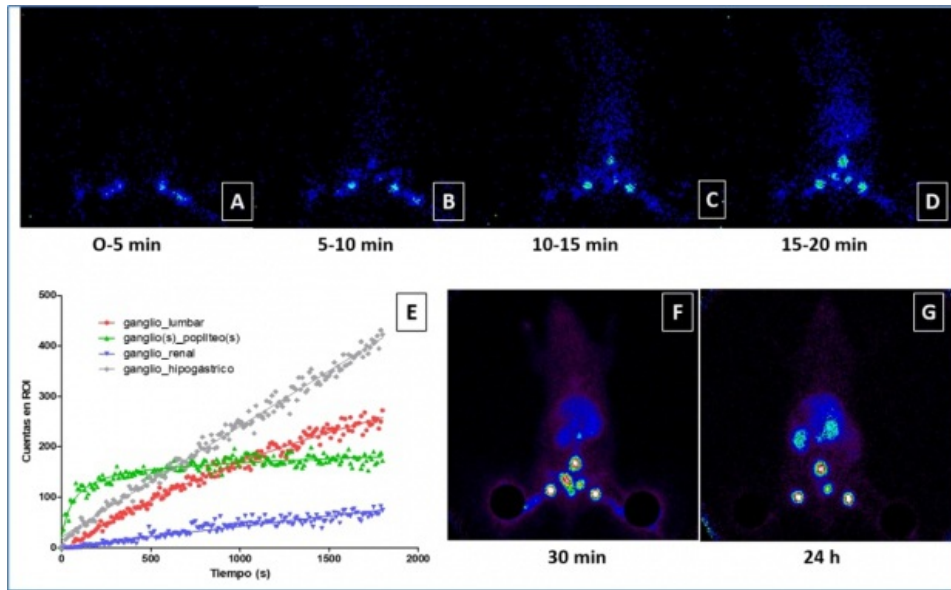


**Figura 5** Caracterización nanotecnológica del agente multimodal.

## Determinación del comportamiento biológico del agente multimodal para la identificación de ganglios linfáticos

Como punto de partida se determinó el perfil de migración del radiofármaco coloidal para obtener los tiempos de trabajo de referencia para la adquisición de imágenes radioisotópicas pre-quirúrgicas y la posterior extracción de ganglios linfáticos mediante la obtención de imágenes fluorescentes intra-quirúrgicas. La figura 6 muestra en la linfocentellografía el ascenso

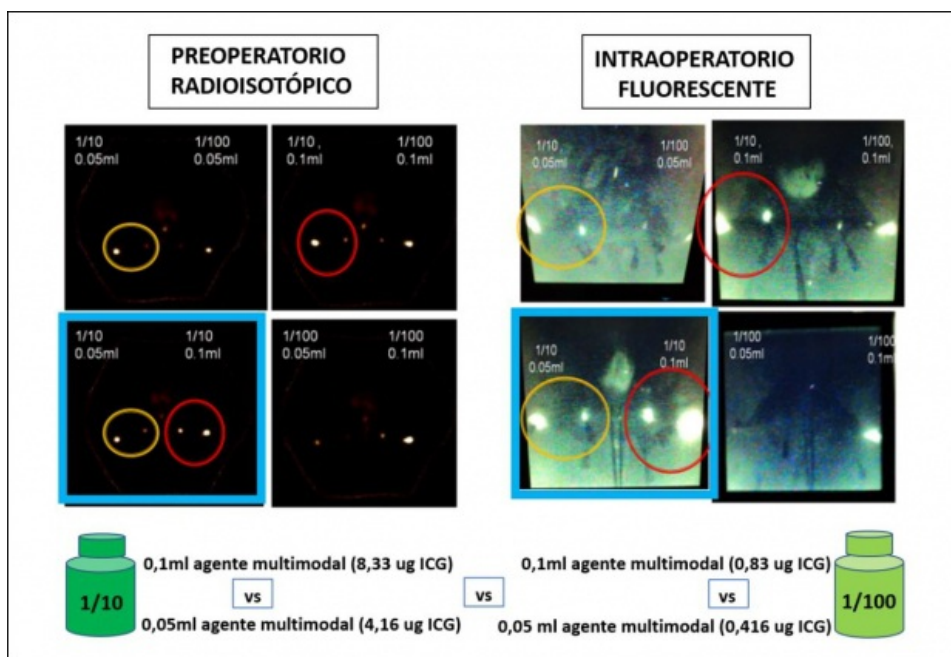
simétrico del radiocoloide en forma secuencial desde el sitio de administración y en dirección ascendente por los vasos linfáticos de los miembros inferiores. Alrededor de los 30 minutos el ascenso se ha completado y la captación permanece en los mismos sitios de visualización hasta las 24 horas luego de la administración. El análisis cuantitativo del perfil de migración del  $^{99m}\text{Tc}$ -GCB, considerando las regiones de interés sobre los principales ganglios linfáticos de la rata y las respectivas curvas de actividad/tiempo, resultó concordante con el análisis cualitativo.



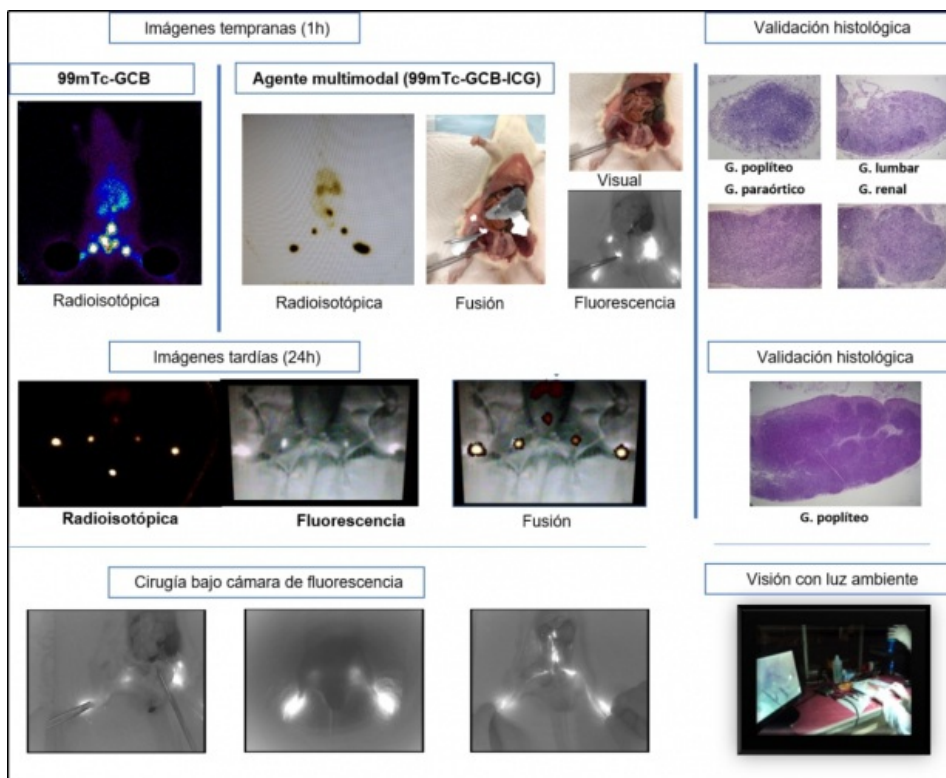
**Figura 6** Perfil de migración del  $^{99m}\text{Tc}$ -GCB en animales de experimentación.

La puesta a punto en la concentración de ICG, así como del volumen final de agente multimodal a administrar, se llevó adelante en el modelo animal por evaluación de la calidad de las imágenes de los ganglios linfáticos a tiempos tardíos con cada modalidad de detección. De esta forma, se evaluó la situación más diferida entre la administración y la cirugía en cuanto a la conservación de detección. Así, la combinatoria de la información de las imágenes preoperatorias y las intraoperatorias mostró que la dilución 1/10 de ICG brinda una señal adecuada para la detección en quirófano de los GL y que los volúmenes finales de 0,1 o 0,05 mL son adecuados para la administración (fig. 7). Por lo tanto, el volumen definitivo de la administración podría ajustarse de acuerdo con el peso del animal en los siguientes ensayos, el cual en nuestro caso fue fijado en 0,05 mL.

Finalmente, luego de poner a punto todas las variables intervinientes en el protocolo, se realizó la identificación de los GL utilizando el agente multimodal, simulando dos situaciones quirúrgicas: a tiempos tempranos y tardíos (fig. 8).



**Figura 7** Comparativa de concentración de ICG y volúmenes de administración de agente multimodal en imágenes radioisotópicas y fluorescentes.



**Figura 8** Identificación de GL confirmada por análisis histológico a partir de la visualización prequirúrgica de las imágenes radiactivas e intraquirúrgicas fluorescentes a tiempos tempranos y tardíos en animales sanos.

Las imágenes intra-operatorias obtenidas por visualización directa del tejido en el monitor que captura la imagen de fluorescencia en la cámara de uso quirúrgico, permiten la rápida localización de los ganglios correspondientes al drenaje de la almohadilla plantar de la rata. Esto se logra debido a la plena coincidencia del posicionamiento identificado en las imágenes preoperatorias con la observación de la señal fluorescente una vez que los tejidos fueron expuestos quirúrgicamente. Cabe destacar que la localización de los GL fue posible aún en presencia de la luz provista por los artefactos luminosos del quirófano, sin interferencia.

## Conclusión

En este trabajo hemos unificado en una forma simple y rápida la preparación de un agente híbrido para detección intraoperatoria de GC. Esta práctica es de suma importancia para facilitar la tarea radiofarmacéutica en un servicio de medicina nuclear garantizando la uniformidad y calidad en el producto, obtenido con pasos sencillos. A su vez, representa una ventaja respecto a otros radiocoloides cuya preparación requiere gran número de operaciones, como considerar el orden correcto de agregado de reactivos y pasos que requieren temperaturas y tiempos de incubación estrictos, ya que estas variables influyen en el tamaño de partícula, su distribución y la pureza radioquímica final, y por tanto en su desempeño diagnóstico<sup>(16-18)</sup>. Los ensayos realizados demostraron que la señal provista por el agente radiactivo y el agente fluorescente no presentan interferencias en la preparación final y que su distribución biológica resulta en concordancia a lo esperado en una linfocentellografía convencional. Si bien no se encuentra claro el mecanismo que permite la co-localización de las señales, podría existir algún tipo de interacción entre la ICG y la gelatina de colágeno bovina que constituye la base del radiocoloide ya que, de acuerdo con la selección de las proporciones de los componentes y sus concentraciones, el volumen de administración y los mecanismos de localización evidenciados, la resultante es un agente doble modalidad. En efecto, ambas sustancias no se ven mutuamente afectadas por la combinación, sino que conforman un trazador multimodal permitiendo la localización intraoperatoria del GC mediante doble señal, siguiendo en tiempo real la imagen de fluorescencia en el monitor de la cámara y la radiactividad mediante el detector portátil.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Universidad de Buenos Aires a través del proyecto UBACYT 20020170200370BA (Directora: Dra. Jimena Salgueiro).

## Referencias



01. Newman EA, Newman LA. Lymphatic mapping techniques and sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Surg Clin N Am* 2007; 87:353-64.
02. Newman LA. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients: a comprehensive review of variations in performance and technique. *J Am Coll Surg* 2004; 199:804-16.
03. Sentinel lymph node biopsy. National Cancer Institute Web site. <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging/sentinel-node-biopsy-fact-sheet> Updated June 25, 2019. Accessed July 20, 2020.
04. Hackethal A, Hirshburger M, Eicker SO, et al. Role of indocyanine green in fluorescence imaging with near-infrared light to identify sentinel lymph nodes, lymphatic vessels and pathways prior to surgery. A critical evaluation of options. *Geburtsh Frauenheik* 2018; 78: 54-62.
05. Park YM, Quan YH, Kwon KH, et al. Endoscopic sentinel lymph node biopsy using indocyanine green-neomannosyl human serum albumin. *Laryngoscope* 2018; 128:135-40.
06. Tsuyuki S, Yamaguchi A, Kawata Y, Kawaguchi K. Assessing the effects of neoadjuvant chemotherapy on lymphatic pathways to sentienl lymph nodes in cases of breast cancer: usefulness of the indocyanine green-fluorescence method. *Breast* 2015; 24:298-301.
07. Alander JT, Kaartinen I, Laakso A, et al. A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *Int J Biomed Imaging* 2012; 940585.
08. Buckle T, Van Leeuwen A, Chin P, et al. A self-assembled multimodal complex for combined pre- and intraoperative imaging of the sentinel lymph node. *Nanotechnology* 2010; 21:355101.
09. Buckle T, Chin P, Van Leeuwen F. (Non-targeted) radioactive/fluorescent nanoparticles and their potential in combined pre- and intraoperative imaging during sentinel lymph node resection. *Nanotechnology* 2010; 21:482001.
10. Van Leeuwen AC, Buckle T, Bendle G, et al. Tracer-cocktail injections for combined pre- and intraoperative multimodal imaging of lymph nodes in a spontaneous mouse prostate tumor model. *J Biomed Opt* 2011; 16:016004.
11. Van Den Berg NS, Buckle T, Kleinjan G, et al. Hybrid tracers for seninel node biopsy. *Q J Nucl Med Imaging* 2014; 58:193-206.
12. Araki K, Mtzokami D, Tomifuji M. Novel indocyanine green-phytate colloid technique for sentinel node detection in head and neck: mouse study. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2014; 151:279-85.
13. Cherrick GR, Stein SW, Leevy CM, et al. Indocyanine green: observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J Clin Invest* 1960; 39:592-600.
14. Psimadas D, Oliveira H, Lecommandoux S, et al. Polymeric micelles and vesicles: biological behavior evaluation using radiolabeling techniques. *Pharm Dev Technol* 2014; 19:189-93.
15. Ballinger J. Formulation of radiopharmaceuticals. In: *Sampsons Textbook of Radiopharmacy*. 4th ed, London, United Kingdom: Pharmaceutical press; 2011: 325.
16. Wilhelm AJ, Mijnhout GS, Franssen EJF. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection. An overview. *Eur J Nucl Med* 1999; 26(S): S36-S42.
17. Michenfelder MM, Bartlett LJ, Mahoney DW, et al. Particle-size and radiochemical purity evaluations of filtered 99mTc-sulfur colloid prepared with different heating times. *J Nucl Med Technol* 2014; 42: 283-8.
18. Tsopeles C. Particle size analysis of 99mTc-labeled and unlabeled antimony trisulfide and rhenium sulfide colloids intended for lymphoscintigraphic application. *J Nucl Med* 2001; 42: 460-6.