

Determinación de niveles de oxigenación en tejido y metabolismo mitocondrial humano in-vivo mediante espectroscopia del infrarrojo cercano

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ingeniería: Área Ingeniería Biomédica

Ricardo F. Botero Correa

Director:

Henry Hermel Andrade Caicedo, I.Eo., Ph.D.



UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
MAESTRÍA DE INGENIERÍAS
MEDELLÍN
2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Junio 2016

A mi esposa Olga Lucia, mi apoyo incondicional, compañera de aventuras. A mi hija Sara Isabel, mi motivación.

A mis padres, mi ejemplo de disciplina, amor por la vida y lealtad.

Contenido

Glosario	1
Lista de Tablas	3
Lista de Figuras.....	4
Agradecimientos	7
Introducción	8
Planteamiento del problema	8
Justificación	8
Objetivo	8
Organización.....	8
Preguntas de investigación	9
1 Marco Teórico	10
1.1 Respiración y metabolismo en los tejidos.....	10
1.1.1 Respiración y transporte de oxígeno a los tejidos	10
1.1.2 Metabolismo Celular	10
1.1.3 Sepsis.....	14
1.1.4 Hipoxia Citopática	15
1.2 Detección de hipoxia celular	15
1.2.1 Niveles de lactato	15
1.2.2 Saturación venosa	16
1.2.3 Otras herramientas	16
1.3 Principios de detección óptica.	17
1.3.1 Espectro Electromagnético.	17
1.3.2 Transmisión de la luz en tejidos	18
1.3.3 Principios de cuantificación especies moleculares en tejidos.....	19
1.3.4 Mediciones experimentales	21
1.4 Especies moleculares y su detección por medios ópticos	21
1.4.1 Cromóforos.....	21
1.4.2 Mioglobina y Melanina.....	22
1.4.3 Cuantificación de Cromóforos.....	23
1.4.4 Cuantificación del metabolismo mitocondrial	24
1.5 Instrumentación	25
1.5.1 Espectroscopia	25

1.5.2	Instrumentos de Dominio de Tiempo	25
1.5.3	Instrumentos de Dominio-Frecuencia.....	26
1.5.4	Instrumentos de onda continua.....	26
1.5.5	Instrumentos de Banda Ancha – Onda Continua.....	27
2	Estado del arte	28
2.1	Uso de sistema NIRS para monitorización del paciente crítico.....	28
2.2	Resumen e hipótesis de esta tesis	29
3	Materiales y Métodos	29
3.1	Instrumentación.....	30
3.1.1	Consideraciones sobre la instrumentación	31
3.1.2	Componentes del sistema.....	31
3.1.3	Volumen sondeado	35
3.1.4	Características del sistema de espectroscopia de tejidos en medidas en tejidos	36
3.2	Toma de medidas NIRS.....	36
3.2.1	Parámetros de adquisición.....	37
3.2.2	Localización anatómica	40
3.2.3	Generación de medidas dinámicas	41
3.2.4	Espectros	42
3.2.5	Implementación del algoritmo.....	42
3.2.6	Descripción del algoritmo	43
3.2.7	Protocolos	44
3.3	Análisis de resultados.....	51
4	Resultados	52
4.1	Medidas en voluntarios.....	52
4.2	Resultados de mediciones clínicas	53
4.2.1	Resultados HbO ₂ y HHb.....	53
4.2.2	Resultados HbO ₂ y CCO	54
4.2.3	SO ₂ – CCO	55
4.3	Análisis comparativo con trabajo de la Universidad de Ryerson.....	55
5	Discusión	62
5.1	Comparación de pendientes de oclusión y recuperación	62
5.2	Viabilidad del seguimiento al metabolismo mitocondrial	64
5.3	Limitaciones	65
6	Conclusiones.....	66

Referencias.....	68
Apéndice A	79
BREVE CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LA ESPECTROSCOPIA APLICADA A MEDICIONES MÉDICAS.	79
Apéndice B	81
ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD	81
Apéndice C.....	84
ECUACIÓN DEL TRANSPORTE RADIATIVO.....	84
Apéndice D	87
CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN ESTE ESTUDIO.	87

Glosario

Este glosario se incluye a beneficio de los ingenieros que lean esta tesis. Algunos de estos términos son usados en el texto de la tesis, otros no, pero se encuentran mencionados en las referencias usadas y puede ser útil su definición en este sitio.

- **Absorción – Absorbancia:** Es la propiedad de la materia de absorber energía de los fotones. Esta absorción se manifiesta por una atenuación del haz radiativo incidente. La absorción es una medida de la atenuación de la energía radiante al atravesar la materia.
- **Atenuación:** Es la pérdida de intensidad de una radiación al atravesar un medio. La atenuación no solo puede ocurrir por el proceso físico de absorción, sino por procesos de reflexión, dispersión y otros procesos físicos.
- **Cara Volar:** En antebrazo, la cara que está en el mismo lado de la palma de la mano. También se conoce como cara palmar.
- **Citocromo C Oxidasa:** Para describir este citocromo, se usa la sigla CCO en esta tesis. Parte del complejo enzimático responsable de la respiración celular y ubicado en la membrana mitocondrial.
- **Citocromo:** Son una familia de proteínas relacionadas que tienen grupos prostéticos hemo que contienen iones de hierro y cobre. Participan en el metabolismo mitocondrial.
- **Corriente de oscuridad:** (Dark Current) Es una corriente eléctrica que corre por sensores de luz cuando no están iluminados. Este es uno de los tipos de ruido propio de instrumento en espectroscopia.
- **Cromóforo:** Portador del color. Parte de una molécula responsable del color.
- **Disoxia:** Situación donde se limita la producción del ATP por el oxígeno, impidiendo el metabolismo mitocondrial.
- **DO₂:** (En inglés: *Global delivery of oxygen*) Es el volumen total de oxígeno entregado a los tejidos por minuto, sin tomar en cuenta la distribución del flujo de sangre.
- **FiO₂:** (En inglés: *Inspired oxygen percent.*) Se define como la fracción de oxígeno inspirado que participa en el intercambio de gases. En respiración atmosférica normal, este es cercano al 21%. Oxígeno adicional suministrado mediante cánula o máscara incrementa este porcentaje que no puede ser del 100% por riesgo de toxicidad.
- **Grupo Prostético:** Es una molécula no-proteína, requerida para la actividad de una proteína.
- **Hematocrito:** % del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos.
- **Hemo:** Un grupo prostético, como lo hemoglobina.
- **Hiperemia reactiva** (Inglés: Reactive Hyperemia): incremento transitorio de flujo sanguíneo en los órganos que ocurre luego de un período breve de isquemia.
- **Hipoxia:** Deficiencia en la bio-disponibilidad de oxígeno a los tejidos del cuerpo.
- **Integration Time:** Tiempo de integración, es análogo al tiempo de exposición de una cámara. Es el tiempo que se le permite recoger fotones al detector del espectroscopio antes de pasar la carga acumulada al convertidor Análogo/digital para su procesamiento.
- **Lactato:** Componente del metabolismo anaeróbico. Los niveles en la sangre pueden aumentar cuando la demanda de energía en los tejidos excede la disponibilidad de oxígeno en la sangre.
- **NADH:** Niacin Adenin dinucleótido. Enzima de respiración celular, encontrada en la membrana mitocondrial.
- **NIRS:** Sigla o acrónimo proveniente del inglés, *Near infrared spectroscopy*, o Espectroscopia del infrarrojo cercano.

- **Onda Continua** (Instrumentación espectroscópica): Instrumentación donde se mide únicamente la intensidad de la luz que retorna.
- **Parámetro**: Valor medible que se elige para analizar o valorar una situación. Para esta tesis, son parámetros las medidas de concentración ópticas como CCO, HbO₂ y Hbb
- **Perfusión**: Paso de un líquido a través de un órgano o un área determinada del cuerpo.
- **Propiedades Ópticas del tejido**: Coeficientes de absorción y de dispersión del tejido particular.
- **Punto isobéptico**: una longitud de onda determinada en la cual la absorción de la luz de una solución mezclada permanece constante a medida que el equilibrio entre los componentes en solución cambia. En la Hemoglobina, un punto isobéptico entre fracción oxigenada y la desoxigenada ocurre en los 806 nm (Jacques, 2013)
- **Redox**: reacciones de óxido-reducción. Involucran pérdida de electrones en uno de los elementos.
- **S_cVo₂**: Saturación venosa central. Una medida
- **StO₂**: Saturación tisular de oxígeno.
- **Valores dinámicos** (Inglés: Dynamic values), registrados durante una oclusión temporal.
- **VO₂**: Consumo global de oxígeno. Es el volumen total de oxígeno removido de la sangre por los tejidos debido al metabolismo oxidativo.

Lista de Tablas

Tabla 1 Resumen de algunos equipos disponibles comercialmente que miden oxigenación de tejidos, considerados inicialmente para los propósitos del proyecto.	30
Tabla 2 Características técnicas del espectroscopio Ocean Optics QE65Pro	32
Tabla 3 Características de la fuente de luz.	35
Tabla 4 Protocolo y condiciones de medidas tomadas en voluntarios.	45
Tabla 5 Procedimiento de inclusión de pacientes en el estudio de oxigenación de tejidos en paciente crítico mediante NIRS. (adaptado de (Ortiz-Trujillo, 2012).	49
Tabla 6 Continuación del procedimiento de inclusión, Variables a recolectar y muestra que deben ser recogidas.....	50
Tabla 7 Parámetros de toma de datos con oclusión venosa.	51
Tabla 8 Parámetros de toma de datos con oclusión arterial.....	51
Tabla 9 Pendientes de Oclusión y Recuperación promedio obtenidos de los 13 pacientes analizados, para tomas en oclusión arterial. Se presentan las pendientes de ajuste a un modelo lineal, en el tramo de oclusión (mO) y de recuperación (mR). Las pendientes o rata de cambio de las unidades que representan concentración expresadas en sus unidades $\mu\text{M}/\text{min}$ y en el caso de saturación $\%/\text{min}$. El ajuste es expresado como el cuadrado de los residuales calculados.	63
Tabla 10 Pendientes (rata de cambio) de trazos de SaO2 obtenidos en pacientes sépticos. Para este estudio se incluyeron 13 pacientes. Los datos presentados para las pendientes en el tramo de oclusión y de recuperación en oclusión arterial hecha en antebrazo. Los datos fueron obtenidos para este estudio en antebrazo (cara palmar, tercio medio) y los estudios comparados fueron tomados en mano (eminencia tenar).	64

Lista de Figuras

Figura 1 Modos de generación de ATP. Tomada de (Kahn, 2015b)	11
Figura 2 Diagrama simplificado del transporte de protones a través de la membrana interior de la Mitochondria. El sistema de transporte (Cadena de electrones) genera movimiento de H^+ . El movimiento de protones en el gradiente genera el ATP. Tomada de: (Barret et al., 2010)	11
Figura 3 Cadena de transporte de electrones. Tomada de: (Kahn, 2015b).....	12
Figura 4 Transporte de protones por la CCO Tomada de: (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002)	12
Figura 5 El ciclo comienza con todos los grupos prostéticos en sus formas oxidadas (que se muestran en azul). La reducción del citocromo C introduce un electrón que reduce el grupo Cu_b . Un segundo citocromo C es reducido lo que reduce el hierro en el hemo a3. A este centro Fe^{2+} se une el oxígeno. Dos electrones se transfieren al oxígeno unido para formar peróxido, que tiende un puente entre el hierro y Cu_b . La introducción de un electrón adicional por una tercera molécula de citocromo C reducido escinde el enlace O-O y resulta en la captación de un protón de la matriz. La introducción de un electrón final y tres protones más genera dos moléculas de H_2O , que se liberan de la enzima para regenerarse al estado inicial. Los cuatro protones se encuentran en las moléculas de agua provienen de la matriz. Tomada de (Berg et al., 2002).....	13
Figura 6 Generación de ATP Tomado de (Kahn, 2015b).....	14
Figura 7 Espectro de radiación electromagnética, con la región infrarroja destacada. La ventana terapéutica es un rango dentro del NIR que esta entre 600-1300 nm.	18
Figura 8 Principio de la Ley de Lambert-Bouger. Diagrama: Daniel Gallego González.....	19
Figura 9 Espectros de absorción (en base logaritmo natural) para diferentes cromóforos que se encuentran en tejidos humanos. Tomada de (Scholkmann et al., 2014).....	22
Figura 10 Espectro Específico de Absorción de los cromóforos de interés en oxigenación de tejidos. Se destaca la ventana óptica, región del espectro infrarrojo donde la penetración de la luz en tejidos es mayor, por la minimización de la absorción del agua. Tomado de (Toronov, 2015).....	23
Figura 11 Principio físico instrumentación dominio de Tiempo. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014).....	25
Figura 12 Principio físico instrumentación Dominio de Frecuencia. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014) .	26
Figura 13 Principio físico de detección de cambios de concentración en cromóforos con equipos de Onda Continua. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)	26
Figura 14 Optodos comerciales, varios fabricantes. Aplicación en medidas cerebrales. Tomado de (Dix, van Bel, Baerts, & Lemmers, 2013; "NIRO 200 NX - Near Infrared Oxygenation Monitor: A highly functional tissue oxygenation monitor," 2015)	28
Figura 15 Sistema NIR integrado, que permitió hacer tomas de espectros experimentales y clínicos.....	32
Figura 16 La luz de retorno se recibe en el instrumento a través de la hendidura de entrada (1).A continuación, una ranura intercambiable regula la cantidad de luz que entra al instrumento y controla	

la resolución espectral. Un filtro (3) enseguida asegura que la radiación que entra al instrumento esté en el rango espectral determinado. Un espejo colimador (4) enfoca la luz que entra para que incida sobre la rejilla de refracción, que la separa en los componentes espectrales que la componen. Finalmente la radiación que proviene de la rejilla de refracción se enfoca mediante un espejo (6) al detector (8). Fuente (“Ocean Optics,” 2015).....	33
Figura 17 Brazaletes de antebrazo. a) Sujetadores auto ajustables al contorno del brazo con adhesivo velcro, b) bloque material EVA negro, para evitar entrada de luz externa, c) fibras emisión-detección, d) agujeros espaciados en tramos de 10 mm.	34
Figura 18 Espectro base entregado por espectroscopio en medidas de oxigenación de tejidos (fuente: (“Professor Vladislav Toronov,” 2015).....	35
Figura 19. La penetración de la luz dependerá de la distancia entre el par fuente-detector (Fuente: (“Professor Vladislav Toronov,” 2015).....	35
Figura 20 Características del sistema en tomas de medidas experimentales in-vivo en antebrazo. Tiempo de integración, 100 ms, promedio de escaneo de 1 y ancho de furgón de 0. Los valores mostrados corresponden al pico máximo de la curva cruda espectral en tejido en antebrazo alrededor de 800 nm.	36
Figura 21 Ventana de visualización de Spectrasuite	37
Figura 22: Cuadro de adquisición rápida.	38
Figura 23 Toma de datos espectrales, en prueba de oclusión.	40
Figura 24 Ventana de Espectro: Eje abscisa, Longitud de onda (nm); Eje ordenadas, Intensidad (cuentas) ...	42
Figura 25 Espectros específicos de HbO ₂ , HHb y CCO. Bandas de longitud de onda para ajustar cada cromóforo como se describe en el texto.	44
Figura 26 Concentración de cromóforos en prueba de oclusión. Dox es la medida de la Hemoglobina Oxigenada (HbO ₂). Ddx es la medida de la hemoglobina desoxigenada (HHb). (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.).....	45
Figura 27 Registro de cromóforos en prueba de oclusión. HbO ₂ vs. CCO, cada uno de estos trazos tiene su propia escala, ajustados para efectos de comparación. (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.)	46
Figura 28 Trazo de Saturación de oxígeno en tejidos, acompañado de un trazo de actividad redox de CCO. Las pendientes de de-saturación y re-saturación representan el balance de entrega DO ₂ y consumo VO ₂ de O ₂ . (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.).....	47
Figura 29 Trazos en el tiempo del comportamiento de la hemoglobina total (tHb) y Agua (H ₂ O) (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.).....	48
Figura 30 Trazo de HbO ₂ y CCO, en tomas de medidas en voluntario sano	52
Figura 31 Trazos de HbO ₂ (Dox) y HHb (Ddx) en oclusión arterial (A) y venosa (B).....	53

Figura 32: HbO ₂ (Dox en la gráfica) y HHb (Ddx) trazo para paciente séptico admitido en el estudio. Las líneas verticales punteadas muestran los tiempos aproximados del comienzo y fin de la oclusión.	54
Figura 33 Trazo de HbO ₂ y CCO en toma de medidas de paciente séptico.	54
Figura 34 Trazo de SO ₂ y CCO	55
Figura 35 Trazos de Hemoglobina total THb = HbO ₂ + HHb. Estos trazos dan una idea del comportamiento de la Hemoglobina total en cada una de las tomas de medidas. En A, se puede ver el comportamiento del trazo para tomas de medidas con oclusión arterial. B, medidas en oclusión arterial que muestran un trazo incremental, lo que les da la clasificación de realmente venosas (Actually Venous). En C medidas en oclusión venosa.	57
Figura 36 Trazos de comportamiento HbO ₂ , para A: Oclusión arterial (OA), B: OA con comportamiento Oclusión Venosa (OV) C: OV	58
Figura 37 Trazos de comportamiento de HHb, para A: OA, B: OA con comportamiento OV C: OV	59
Figura 38 Trazos de comportamiento de CCO para A: OA, B: OA con comportamiento OV, C: OV	60
Figura 39 Trazos de comportamiento de SO ₂ para A: OA, B: OA con comportamiento OV, C: OV	61

Agradecimientos

Este trabajo se enmarca bajo el proyecto presentado por la facultad de Medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana, y recibió apoyo económico de Ruta N. A través del Grupo de Investigación de Biología de Sistemas, en cabeza de la Dra. Isabel Ortiz, se presentó el proyecto *Diseño y construcción de un equipo biomédico no invasivo que permita medir diferentes variables para determinar el nivel de oxigenación en la valoración del daño mitocondrial en pacientes críticos* y esta tesis es uno de los requisitos comprometidos para el cumplimiento de los objetivos de dicho proyecto pactados con el ente municipal que suministró el apoyo.

Quiero agradecer el apoyo prestado por los participantes en el proyecto en cabeza de su directora y muy especialmente al Dr. Jorge Bejarano por su confianza y apoyo permanente.

Así mismo deseo agradecer la guía y ayuda del director de esta tesis el Dr. Henry Andrade quien supo orientar mis esfuerzos en estos temas.

Quiero destacar el espíritu de compañerismo y ayuda que tiene todo el personal del Centro de Bioingeniería de la Universidad Pontificia Bolivariana, mi oficina durante este trabajo. Esto refleja el liderazgo y principios de investigación del Dr. John Bustamante, su director que auguran logros importantes. En particular quiero ofrecer mis agradecimientos al Dr. Andrés Orozco, quien de manera muy desinteresada siempre estuvo dispuesto a colaborar con esta tesis y sus esfuerzos entendiendo el complejo campo del análisis de señales.

Introducción

Planteamiento del problema

La sepsis es la principal causa de muerte en pacientes críticos. En Colombia el desafío de la sepsis puede ser entendido con los resultados de un estudio de cohorte reciente realizado en diez hospitales universitarios en el país. Este estudio mostró que el 94% de los pacientes infecciosos admitidos en salas de emergencia, unidades de cuidados intensivos (UCI) y hospitalización cumplía con al menos un criterio de sepsis y 62% cumplían con al menos un criterio de sepsis severa. En general la mortalidad de pacientes sin sepsis, sepsis sin disfunción orgánica, sepsis severa sin shock y shock séptico fue 3%, 7.3%, 21.9% y 45.6% respectivamente (Rodríguez et al., 2011).

Los métodos de diagnóstico y pronóstico de la sepsis en uso actualmente son invasivos y en muchos casos lentos. El monitoreo de parámetros hemodinámicos comunes tales como presión arterial, ritmo cardíaco y saturación de oxígeno, son indicadores poco confiables y no correlacionan con las anormalidades en la perfusión micro vascular propias de la sepsis. Parámetros diagnósticos más avanzados como saturación venosa mixta de oxígeno o niveles de ácido láctico requieren de tomas de muestra de sangre periférica. Y aun estos valores pueden no correlacionarse con la severidad de la hipoperfusión tisular (Leichtle, Kaoutzanis, Brandt, Welch, & Purtil, 2013).

Justificación

La detección objetiva de la sepsis a tiempo puede ayudar a disminuir estas cifras dramáticas de la mortalidad debida a la sepsis. La evaluación de la función mitocondrial mediante la detección temprana de hipoxia citopática en pacientes críticos con sepsis, sepsis severa y shock séptico a partir de técnicas de espectroscopia pondrá a disposición un diagnóstico temprano, con el fin de utilizar un tratamiento adecuado y eficaz para los pacientes, disminuyendo las tasas de letalidad y los índices de mortalidad de las unidades de cuidados intensivos de nuestro País (Ortiz-Trujillo, 2012).

La ciencia médica busca biomarcadores específicos de disoxia tisular que ayuden al diagnóstico temprano y puedan mejorar el desenlace de los pacientes sépticos mediante un tratamiento indicado a tiempo (García-Simon et al., 2015).

Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo, evaluar el nivel de oxigenación en tejido muscular humano in-vivo mediante métodos ópticos no invasivos, a través de la cuantificación de especies moleculares asociadas a la respiración celular. Esto con el objetivo de evaluar la posibilidad de que estas medidas se puedan usar en la detección como indicadores de hipoxia citopática y poder relacionar estos hallazgos con el compromiso mitocondrial (Ortiz-Trujillo, 2012)

Organización

Esta tesis de maestría consiste de 6 capítulos. En el capítulo 1 Marco Teórico contiene una descripción del proceso de suministro de oxígeno a los tejidos y las moléculas involucradas en su transporte. A nivel celular se describe el proceso de metabolismo del oxígeno y su aprovechamiento para la producción de energía basada en ATP, haciendo énfasis en las especies moleculares involucradas. Se describe la sepsis y las hipótesis relacionadas con la falla orgánica múltiple. Se

describen los métodos clínicos usados actualmente en el diagnóstico y pronóstico de la sepsis y sus principios y limitaciones. Se describen los principios usados en la detección óptica, incluyendo las ecuaciones matemáticas usadas para cuantificación de especies moleculares. Se describen las diferentes especies moleculares que se asocian al transporte del oxígeno a los tejidos y a su aprovechamiento a nivel mitocondrial. Se describen las diferentes variantes de la instrumentación que han sido usadas para el propósito de seguimiento a oxigenación tisular.

1.1 En el capítulo 1.5 Instrumentación

El siguiente componente determinante de la espectroscopia es la instrumentación. Este es un campo muy amplio, por lo tanto se ha hecho un esfuerzo por mostrar de forma resumida todas las modalidades disponibles en la aplicación de la técnica.

1.1.1 Espectroscopia

El término espectroscopia define un número grande de técnicas que usan la radiación para obtener información de una estructura y las propiedades de la materia. El principio básico que comparten todas las técnicas espectroscópicas es iluminar con un haz de radiación electromagnética una muestra, y observar su respuesta al estímulo. La respuesta se recoge usualmente como una función de la longitud de onda de la radiación. Un trazo de la respuesta como una función de la longitud de onda se conoce como un espectro. (Nonell & Viappiani, 2015)

1.1.2 Instrumentos de Dominio de Tiempo

Generalmente son costosos y de gran tamaño. Su principio básico de funcionamiento está basado en el uso de un láser pulsado que es activado en un tiempo supremamente corto. Un sistema de registro puede detectar la intensidad de la luz y calcular el tiempo entre la emisión del pulso y la recepción de la señal de retorno (**iError! No se encuentra el origen de la referencia.**). Un pulso se parte en dos, uno es dirigido directamente a la cámara electrónica y el otro viaja a través del tejido. Los principios básicos para aplicaciones en mediciones en oxigenación de tejidos se comenzaron a investigar a finales de los años 80 del siglo XX (D T Delpy et al., 1988), donde se estudió la difusión de la luz en tejidos, mediante simulaciones (MonteCarlo), en patrones ópticos (Phantoms) y finalmente en animales. Se encontró que la trayectoria promedio de la luz es igual a 4.3 veces la distancia fuente-detector.

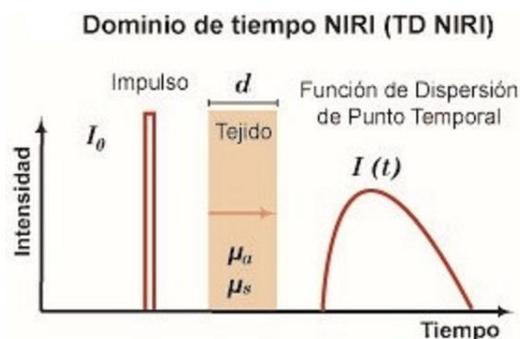


Figura 11 Principio físico instrumentación dominio de Tiempo. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)

Para estos sistemas es fácil verificar el parámetro de desplazamiento de la luz B en las ecuaciones *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* y *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*

$$B = \frac{DP}{\rho} = \frac{c_v \cdot t}{\rho \cdot n_t} \quad 7 \quad [cm]$$

Donde c_v es la velocidad de la luz en el vacío, n_t es el índice de refracción de la luz en tejidos y ρ es la distancia fuente-detector.

1.1.3 Instrumentos de Dominio-Frecuencia

Estos instrumentos modulan una fuente continua de laser en un set de frecuencias dadas y miden el cambio de fase entre la luz que se emite y la que se recibe.

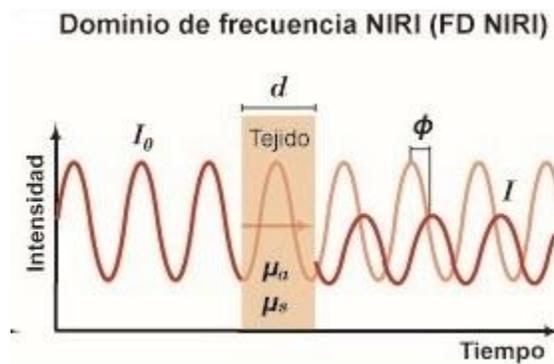


Figura 12 Principio físico instrumentación Dominio de Frecuencia. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)

Para este caso el parámetro B de las ecuaciones *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* y *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* se calcula de la siguiente manera:

$$B = \frac{\phi c_v}{(2\pi f n_t \rho)} \quad 8 \quad [cm]$$

Donde

Φ es el desplazamiento de fase.

F es la frecuencia de modulación de la luz.

ρ distancia fuente-detector

1.1.4 Instrumentos de onda continua

La mayoría de la instrumentación usada en investigación y práctica clínica son instrumentos de onda continua NIRS que usan la ley de Beer-Lambert -Ecuación *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* - para calcular cambios en la concentración de los diferentes cromóforos (Pellicer & Bravo, 2011). La mayoría de estos instrumentos utilizan un número limitado de longitudes de onda (3-5) para resolver cambios de concentraciones de igual número de cromóforos *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.*

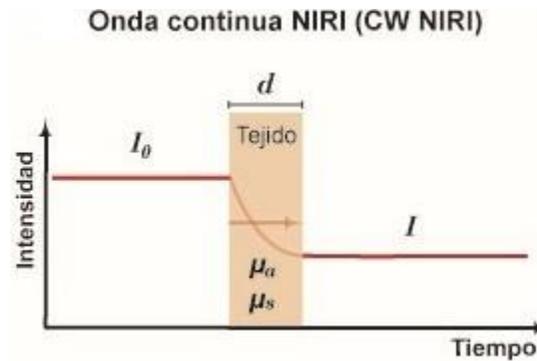


Figura 13 Principio físico de detección de cambios de concentración en cromóforos con equipos de Onda Continua.
Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)

1.1.5 Instrumentos de Banda Ancha – Onda Continua

En este tipo de instrumentación se toma una fuente que emite luz en el rango de 600 nm – 1000 nm y se procesa la forma de la frecuencia de la luz recibida, que cambia de acuerdo a las concentraciones de cromóforos encontrados en los tejidos. El tipo de instrumentación puede ser similar a la usada en onda continua excepto que la fuente tiene un ancho de banda mayor (Bale, Mitra, Meek, Robertson, & Tachtsidis, 2014). También puede ser combinado con el método de Dominio –Tiempo para calcular el factor de distancia B de las ecuaciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

1.1.5.1 Requerimientos de un sistema NIRS

NIRS se presenta entonces como una herramienta para el seguimiento de la hipoxia a nivel celular (Loiacono & Shapiro, 2010). Para derivar medidas de seguimiento del aprovechamiento del oxígeno a nivel tisular se requiere una instrumentación con capacidad de detectar cambios en concentración de cromóforos muy pequeños. Esto impone medir el comportamiento de las enzimas responsables del aprovechamiento del oxígeno ha sido el objetivo de la ciencia desde que Jobsis (Jobsis, 1977) planteó la posibilidad de medir el comportamiento de óxido reducción de las enzimas que participan de la oxidación fosforilativa en la mitocondria. De hecho Jobsis planteó el Citocromo a, a_3 , como el objetivo para seguimiento a la cadena respiratoria. Luego del uso final en la cadena de electrones del oxígeno en el conocido complejo IV, el resultado final es agua.

1.1.5.2 Consideraciones sobre intensidad y precisión

Para tejido cerebral, en la región de 700-1300 nm, la pérdida de intensidad es de aproximadamente un orden de magnitud por centímetro (una densidad óptica DO por centímetro). Esto se incrementa en longitudes de onda más cortas a tres DO por cm, en 514 nm.

A modo de referencia en la sensibilidad del instrumento necesaria para aplicaciones en tejido cerebral los cambios en absorción debidos a la Hemoglobina y al Citocromo a, a_3 están en el orden de 0,1 DO/cm para el primero y 0.07 DO/cm en el caso del citocromo. (D T Delpy et al., 1988)

1.1.5.3 Consideraciones sobre un algoritmo de cuantificación

El análisis de la señal espectral de tejidos in-vivo entregada por un instrumento espectroscópico permite encontrar concentraciones de los diferentes cromóforos. La decodificación de estas señales

para conseguir las medidas se hace mediante manipulaciones matemáticas (Ver sección 1.3.3), que se consignan en un algoritmo de procesamiento de señales digitales. La naturaleza de dicho algoritmo y el nivel de complejidad varía significativamente (Scholkmann et al., 2014). Se utilizó la ecuación de Beer-Lambert, que permite obtener la concentración de una sustancia a partir de la atenuación de un haz de luz que incide sobre ella. Para sistemas complejos como los biológicos esta ecuación pierde validez y se requiere un nivel de modelación matemática más complejo que considere todos los efectos del transporte de la luz en los tejidos, lo que hace dispendiosos los cálculos (Sergio Fantini, Franceschini, & Gratton, 1994; Jacques & Pogue, 2008; Kienle & Patterson, 1997).

No todos los algoritmos presentados por investigadores o proveedores de equipos reciben un escrutinio de pares, se hace necesario entonces establecer puntos de comparación y poder hacer una revisión de resultados desde una perspectiva común (Cooper & Springett, 1997; Matcher, Elwell, Cooper, Cope, & Delpy, 1995).

1.1.5.4 Soporte o brazaletes NIRS

Un problema interesante y poco estudiado es el posicionamiento de las sondas ópticas emisor-receptos en los sitios anatómicos designados para el estudio. Los parámetros para considerar su solución son la estabilidad óptica que impida los artefactos en las medidas, la comodidad del paciente y la facilidad de su aplicación

El papel de un soporte es permitir una rápida intervención del paciente por parte del personal médico, ejerciendo su función con comodidad y al mismo tiempo garantizando estabilidad en las mediciones, que evite artefactos de movimiento.

En estudios previos se han logrado montajes que permiten la toma de medidas en ambientes experimentales (David T Delpy, 1999; S Fantini et al., 1999). En un ambiente clínico y con pacientes reales no es posible contar con el tiempo y las facilidades necesarias para hacer un montaje complejo. Por tal motivo es necesario estudiar soluciones prácticas; en el caso de la monitorización cerebral puede ser difíciles de encontrar (Kassab, 2014). Los fabricantes de equipos han logrado disminuir el tamaño de las sondas mediante fibras ópticas pequeñas y arreglos múltiples (Ver **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)



Figura 14 Optodos comerciales, varios fabricantes. Aplicación en medidas cerebrales. Tomado de (Dix, van Bel, Baerts, & Lemmers, 2013; "NIRO 200 NX - Near Infrared Oxygenation Monitor: A highly functional tissue oxygenation monitor," 2015)

Por lo tanto las fibras necesarias deben tener un núcleo del mayor diámetro posible. Esto hace su sujeción y localización dificultosa. Una fibra óptica debe preservar una curvatura mínima o de otra manera puede resultar dañada ("Bend Radius & Mechanical," 2015).

Otra de las funciones importantes del soporte de las sondas es especificar las distancias entre la sonda de entrada y la de salida, este parámetro es importante en los cálculos de las concentraciones.

Estado del arte, se describen resultados recientes en el campo de la detección de cromóforos por medio de la espectroscopia del infrarrojo cercano. También se discuten los avances en medición de metabolismo tisular y su utilidad clínica.

En el capítulo 4 Materiales y Métodos se discuten las consideraciones que se tuvieron para escoger la instrumentación utilizada en este trabajo. Se presenta el algoritmo de cuantificación utilizado y las condiciones de su uso. Se describen los protocolos seguidos para la obtención de las medidas y su aplicación tanto a nivel experimental como clínica.

En el capítulo 5 Resultados, se presentan las medidas y en el capítulo 6 Discusión se hace una explicación de los resultados en el contexto de lo escrito en esta tesis.

En el capítulo 7 Conclusiones se presentan un resumen de las conclusiones obtenidas durante el desarrollo de este trabajo y la dirección de trabajo futuro que se puede hacer en esta materia.

Preguntas de investigación

¿Cómo establecer la viabilidad de hacer seguimiento NIRS (NIRS por sus siglas en inglés – *Near Infrared Spectroscopy*) a las últimas etapas del metabolismo mitocondrial y bajo cuales condiciones se puede utilizar este biomarcador como herramienta de diagnóstico y/o pronóstico clínico en el caso de la sepsis en el cuidado del paciente crítico?

¿Cuáles son las condiciones técnicas y clínicas que permiten establecer medidas de oxigenación de tejidos periféricos mediante espectroscopia del infrarrojo cercano y utilizar dichas medidas para hacer diagnóstico y pronóstico del paciente crítico con sepsis?

2 Marco Teórico

2.1 Respiración y metabolismo en los tejidos

El propósito de este capítulo es familiarizar al lector con los principios y terminología usados en la espectroscopia NIRS. Para una descripción más profunda consultar las referencias usadas en el capítulo.

2.1.1 Respiración y transporte de oxígeno a los tejidos

La respiración pulmonar cumple el proceso de llevar moléculas de oxígeno a la sangre. El oxígeno presente en el aire pasa al torrente sanguíneo por difusión en los alveolos. La presión parcial del oxígeno en el aire es del orden de 158 mm Hg. Los capilares que rodean las estructuras alveolares proveen la sangre que tiene una presión parcial de oxígeno del orden de los 40 mm Hg (Barret, Books, Boitano, & Barman, 2010) por lo que el proceso de difusión es posible.

La hemoglobina (Hb) es una proteína constituida por cuatro componentes o sub unidades, cada una de ellas contiene una fracción hemo adherida a una cadena polipéptido. Cada grupo hemo es una cadena compleja de porfirina que incluye un átomo de hierro. Así que cada uno de los átomos de hierro puede unirse con el oxígeno de manera reversible con la molécula de O_2 . El hierro permanece en su estado ferroso, por lo que la reacción es de oxigenación y no de oxidación (Barret et al., 2010). La configuración de la estructura de la HB define su afinidad por el O_2 , una vez se hace el primer enlace de O_2 la configuración cambia y su afinidad crece geoméricamente. En los tejidos estas reacciones son reversadas y el oxígeno queda a disposición de los tejidos cuando la presión parcial de oxígeno en ellos es menor de la que tiene la sangre arterial. A esto también contribuye el ambiente ácido que genera el CO_2 producto de la respiración celular (Kahn, 2015a).

Le hemoglobina reducida tiene un color oscuro, y produce una coloración azulada en la piel. Esta condición aparece cuando la concentración de la hemoglobina reducida supera los 5 g/dL.

La mioglobina es un pigmento que contiene hierro, encontrado en el músculo esquelético. Recibe O_2 de la hemoglobina en la sangre, ya que su afinidad con el oxígeno es mayor a medida que la presión pO_2 disminuye. El contenido de mioglobina es mayor en músculos especializados en contracción sostenida (Barret et al., 2010) y su función es proveer un depósito de oxígeno que se puede liberar en la medida de las necesidades o cuando los músculos comprimen las arterias lo que inhibe la distribución de oxígeno a los tejidos.

2.1.2 Metabolismo Celular

La forma en que las células extraen la energía guardada en los alimentos es a través de la respiración celular, una forma catabólica de producir el trifosfato de adenosina (ATP por sus siglas en inglés). El ATP es una molécula de alto contenido energético, que es usado para el trabajo de las células. Existen tres etapas en la respiración celular, glicólisis, el ciclo de ácido cítrico y el transporte de electrones. (Rich, 2003) Cada una de ellas tiene una liberación de ATP asociada, siendo la mayor la correspondiente a la fosforilación oxidativa.

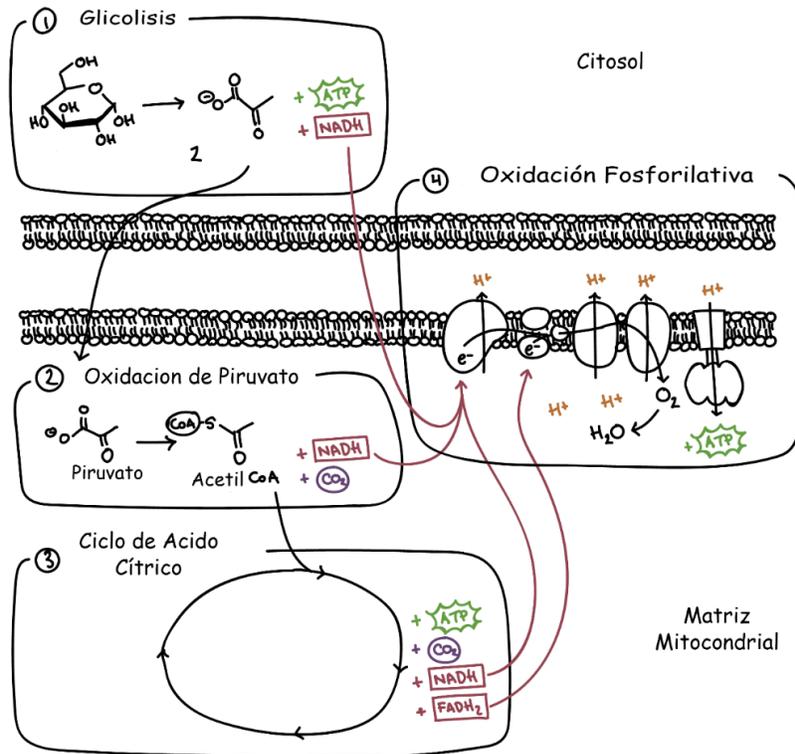


Figura 1 Modos de generación de ATP. Tomada de (Kahn, 2015b)

La fosforilación oxidativa tiene lugar en una organela dentro de las células, la mitocondria, las enzimas que toman parte del proceso se encuentran en la membrana interior de la misma. Se describe como una cadena de electrones y el propósito es crear un gradiente de protones en la membrana que finalmente se utilizará para generar ATP (Barret et al., 2010).



Figura 2 Diagrama simplificado del transporte de protones a través de la membrana interior de la Mitocondria. El sistema de transporte (Cadena de electrones) genera movimiento de H⁺. El movimiento de protones en el gradiente genera el ATP. Tomada de: (Barret et al., 2010)

Las dos fuentes principales de electrones para la cadena oxidativa son NADH y succinato. Los electrones del NADH y el succinato eventualmente toman un camino común a través de la coenzima Q y las enzimas de citocromo, b, c₁, c y aa₃. (Cope, 1991)

El sistema del citocromo es una cadena de enzimas que transfiere hidrogeno al oxígeno, formando agua. Cada enzima en la cadena es reducida y luego oxidada de nuevo a medida que el hidrógeno se mueve en la cadena. El eslabón final de dicha cadena es el citocromo C oxidasa, que transfiere hidrógenos al O₂ formando H₂O. Esta enzima es una proteína que contiene dos átomos de Fe y tres de Cu, conteniendo 13 subunidades. (Barret et al., 2010)

La última etapa de la cadena de electrones ocurre cuando el citocromo C entrega electrones al complejo IV, un grupo enzimático ubicado en la membrana de la mitocondria. Allí los electrones pasan por dos citocromos más, el último de los cuales transfiere los electrones a O_2 , dividiendo al oxígeno para obtener dos moléculas de agua (Kahn, 2015b).

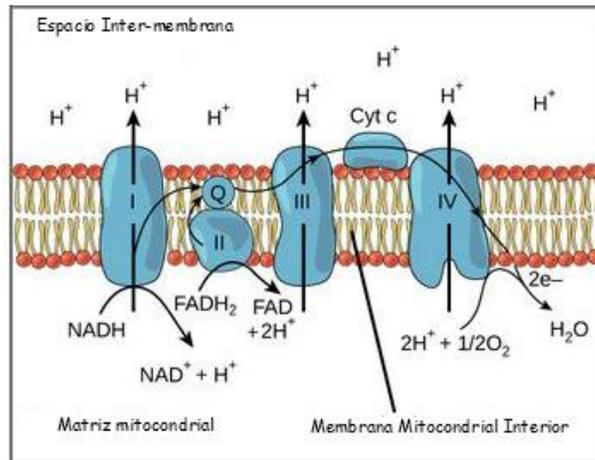


Figura 3 Cadena de transporte de electrones. Tomada de: (Kahn, 2015b)

El mecanismo es más complejo pero en resumen el grupo hemo y el ion de cobre se enlazan fuertemente a la molécula de oxígeno, hasta que sea totalmente reducida y gane electrones y protones para formar agua (Kahn, 2015b).

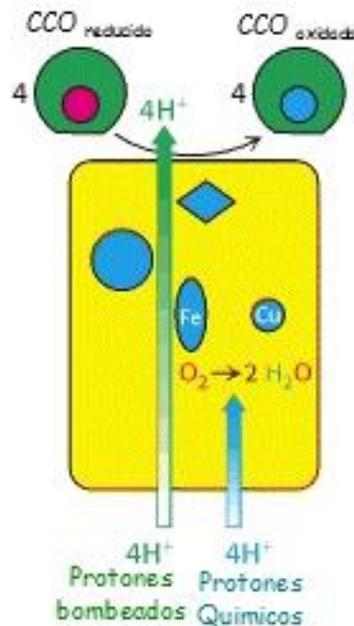


Figura 4 Transporte de protones por la CCO Tomada de: (Berg, Tymoczko, & Stryer, 2002)

El proceso completo y la descripción se pueden encontrar entre otras referencias en (Berg et al., 2002). El complejo del Citocromo C Oxidasa (CCO) (Ver Figura 5) pasa por diferentes estadios intermedios de oxidación-reducción. Esto genera algunos inconvenientes desde el punto de vista de la detección que mencionaremos más adelante.

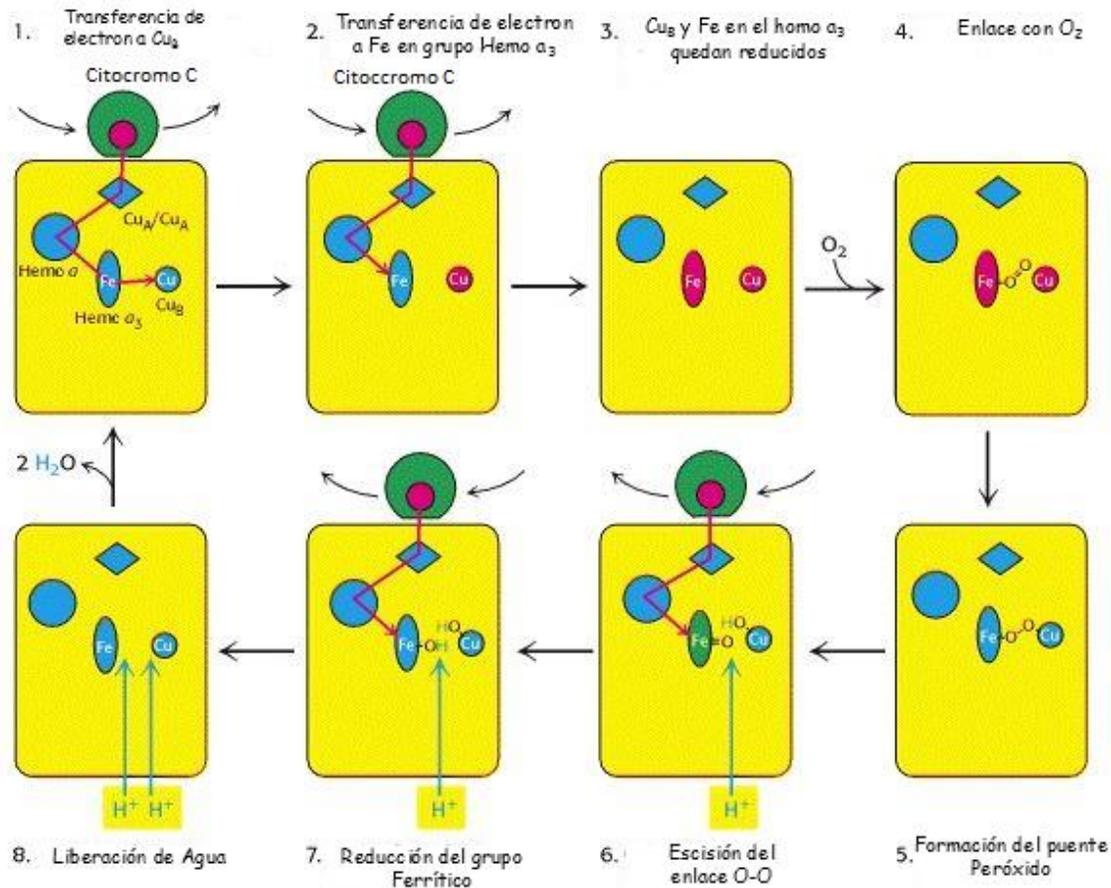


Figura 5 El ciclo comienza con todos los grupos prostéticos en sus formas oxidadas (que se muestran en azul). La reducción del citocromo C introduce un electrón que reduce el grupo Cu_b . Un segundo citocromo C es reducido lo que reduce el hierro en el hemo a_3 . A este centro Fe^{2+} se une el oxígeno. Dos electrones se transfieren al oxígeno unido para formar peróxido, que tiende un puente entre el hierro y Cu_b . La introducción de un electrón adicional por una tercera molécula de citocromo C reduce el enlace O-O y resulta en la captación de un protón de la matriz. La introducción de un electrón final y tres protones más genera dos moléculas de H_2O , que se liberan de la enzima para regenerarse al estado inicial. Los cuatro protones se encuentran en las moléculas de agua provienen de la matriz.
Tomada de (Berg et al., 2002)

Noventa por ciento del consumo de O_2 en el estado basal se hace en la mitocondria, un 80% está destinado a la síntesis de ATP. (Barret et al., 2010) Todos los procesos celulares son potenciados por la energía resultante cuando el ATP es hidrolizado a ADP y fosfato inorgánico (Pi) (Kahn, 2015b).

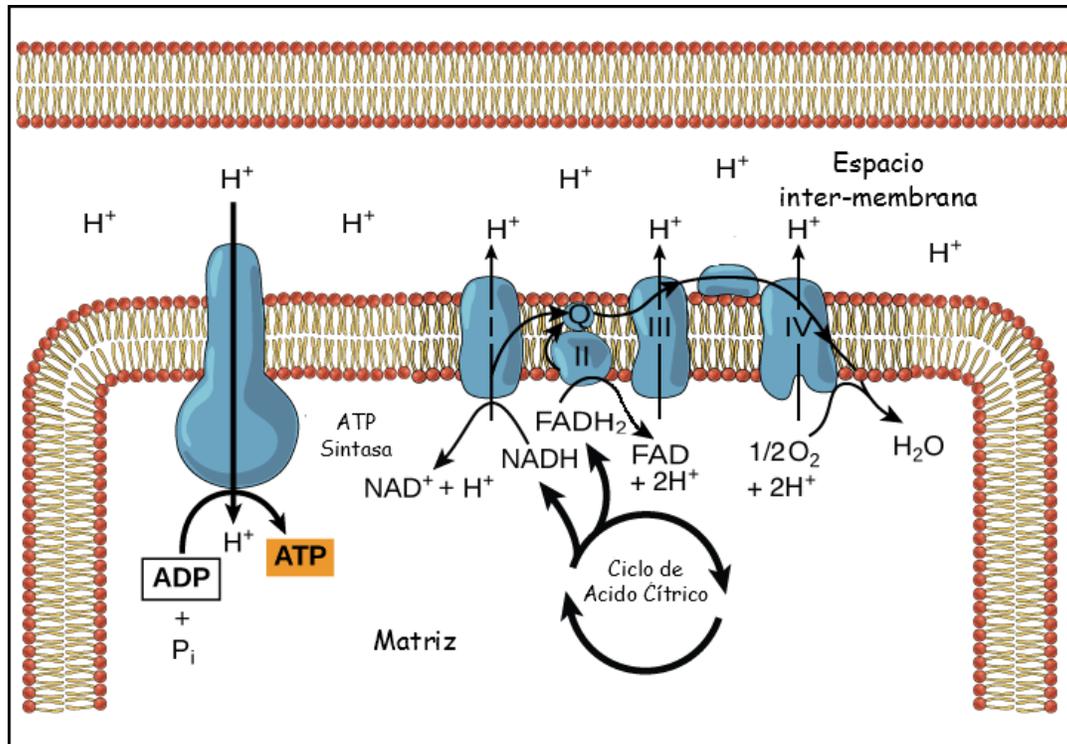


Figura 6 Generación de ATP Tomado de (Kahn, 2015b)

Bajo condiciones fisiológicas normales la tasa de uso del oxígeno por las células está controlada por la tasa de gasto de energía dentro de las mismas - la tasa a la cual ATP se forma a partir del ADP - y no la disponibilidad del oxígeno a las células. (Loiacono & Shapiro, 2010)

El mecanismo de producción de energía de la mitocondria ha sido descrito por varios autores como una maquinaria maravillosa, la energía acumulada en la membrana es del orden de 30 millones de voltios por metro cuadrado, similar a la energía de un rayo o casi mil veces la capacidad del cableado de una casa normal (Lane, 2015). Se estima que un 10% del peso de nuestro cuerpo está constituido por mitocondrias (Lane, 2005).

2.1.3 Sepsis

En su definición más amplia se trata de una inflamación de todo el cuerpo, potencialmente fatal, causada por una infección severa. Mientras que se conocen algunos de los mecanismos de la inflamación, la razón de la muerte celular y de la falla orgánica permanece oscura. Las dos hipótesis más cercanas se derivan de la observación de que la sepsis se asocia con el daño a la capacidad de tomar el oxígeno por parte de los tejidos. En la primera hipótesis se habla de un daño de los vasos sanguíneos y micro capilares que impiden la entrega del oxígeno. La hipótesis alternativa, llamada la hipoxia citopática, habla de la disfunción mitocondrial y el uso del oxígeno de manera ineficaz (Levy & Deutschman, 2007). Esto puede afectar el mecanismo de fosforilación oxidativa y prevenir la formación aeróbica del trifosfato de adenosina (ATP) que potencialmente puede causar la falla orgánica. Dentro de la mitocondria, el llamado complejo IV, también conocido como Citocromo C, juega un papel importante en el consumo de oxígeno, al donar electrones que permiten reducir el oxígeno a agua. Este proceso dentro de la fisiología mitocondrial es considerado el último paso en la respiración y concluido se considera que ha habido un aprovechamiento del oxígeno (Ortiz-Trujillo, 2012).

2.1.4 Hipoxia Citopática

La Hipoxia es la deficiencia en la bio-disponibilidad de oxígeno en los tejidos del cuerpo. Existen tres posibles escenarios que establecen barreras para la oxigenación efectiva de los tejidos.

- Contenido de O_2 inadecuado (VO_2), o sea un ambiente hipóxico, anemia severa, toxicidad de desplazamiento de O_2 (envenenamiento por Monóxido de carbono)
- Transporte de O_2 inadecuado (DO_2) esto es, estados de shock de bajo flujo: shock obstructivo/cardiogénico/hipovolémico/distributivo, embolia específica de órganos o hipoperfusión focal secundario a enfermedad cardiovascular arterioesclerótica.
- Uso ineficiente del O_2 a nivel celular, esto es, metabolismo energético a nivel celular alterado.

Déficits en VO_2 y DO_2 pueden ser manejados con medidas de reanimación. Una vez se logra una compensación, a menudo la falla orgánica múltiple persiste a partir de la disfunción micro circulatoria y disoxia de los tejidos.

El tercer escenario, implica un desarreglo metabólico a nivel celular, conocido como hipoxia citopática, que influye en la disfunción orgánica asociada a la sepsis. La disfunción mitocondrial ocurre a pesar de existir PO_2 adecuado en el citosol. (Loiacono & Shapiro, 2010)

En ausencia de oxígeno, y con suministro de electrones del NADH, todas las enzimas respiratorias se reducirán. Alternativamente en ausencia de electrones que bajen en la cadena, y en la presencia de oxígeno, todas las enzimas se oxidarán(Cope, 1991).

2.2 Detección de hipoxia celular

La aplicación clínica del NIRS sigue siendo una novedad, en un campo donde las medidas de referencia "Gold Standards" no existen. (Lipcsey, Woinarski, & Bellomo, 2012)

Es común en ambientes clínicos el uso de la oximetría de pulso. Esta técnica permite establecer el porcentaje de saturación de oxígeno que tiene la molécula de hemoglobina en la sangre arterial (Barker, Hay, Miyasaka, & Poets, 2002). La molécula de hemoglobina provee 4 puntos de enlace al oxígeno y dependiendo del número de enlaces utilizados en un momento dado se puede hablar de un porcentaje de saturación (Treacher & Leach, 1998). La oximetría puede medir un porcentaje de saturación de la hemoglobina presente en un volumen dado(Zijlstra & B., 1989). Esta medición se realiza de manera continua e inmediata mediante un método espectroscópico en el que fuentes de luz calibradas en una longitud de onda atraviesan el volumen de sangre arterial, sensores en puntos opuestos miden la absorción de la luz y la comparan con el nivel de absorción específica de la hemoglobina saturada (Oxihemoglobina) para este rango espectral entregando así una medida de la saturación. Su utilidad clínica es clara (Aoyagi, 2003), pero no responde todas las preguntas, especialmente en el caso del cuidado crítico(Chan, Chan, & Chan, 2013; Joy & Patrick, 2007).

Los métodos de detección de hipoxia celular en uso clínico frecuente son los que muestran los índices de hipoperfusión global, los cuales están descritos muy brevemente a continuación.

2.2.1 Niveles de lactato

Los niveles elevados de lactato en sangre pueden ser un indicador de metabolismo anaeróbico, que ocurre cuando el oxígeno no está disponible. Estudios ya clásicos en modelos animales demostraron la relación bifásica entre el transporte (DO_2) y el consumo de oxígeno (VO_2). Mientras el DO_2 permanece por encima de un valor conocido como DO_2 crítico el VO_2 se mantiene constante, siempre que la demanda sea constante. El lactato en sangre también permanece constante hasta alcanzar este límite, a partir del cual se incrementa linealmente (Baigorri-González & Lorente Balanza, 2005).

La acidosis láctica ocurre cuando no existe evidencia clínica de hipoxia tisular y los niveles de lactato incrementales son debidos a desbalances atribuidos a estrés metabólico. La sepsis viene acompañada de un estado hipermetabólico en el cual la producción incrementada del ácido pirúvico resulta de la glicolisis aeróbica acelerada inducida por catecolaminas, catabolismo de proteína muscular e inflamación. Cuando la producción de ácido pirúvico excede la capacidad de la mitocondria de metabolizar este sustrato, ya sea por sobrecarga del sustrato o disfunción mitocondrial, se podrá producir hiperlactemia aún en presencia de oxigenación tisular adecuada (Loiacono & Shapiro, 2010). Sin embargo hay que considerar que existen múltiples causas de hiperlactemia, ajenas a la hipoxia tisular, especialmente en la sepsis (Baigorri-González & Lorente Balanza, 2005)

2.2.2 Saturación venosa

La saturación venosa mixta de oxígeno (SvO_2) y la saturación venosa central de oxígeno ($ScvO_2$) son indicadores del aporte de oxígeno tisular (DO_2) y de la perfusión. El monitoreo de la SvO_2 refleja el balance entre el DO_2 y el consumo de oxígeno (VO_2). Las mediciones se pueden tomar intermitentemente por gasometrías venosas y cooximetría o de manera continua a través de un catéter de fibra óptica, técnica que es la indicada en la práctica clínica (Carrillo-Esper, Núñez-Bacarreza, & Carrillo-Córdova, 2007).

Aparte del riesgo (infección y hemorragia) de su aplicación por su carácter invasivo, en situaciones clínicas como el shock séptico, después de las primeras horas de manejo, un nivel normal o inclusive alto de $ScvO_2$ puede ser falsamente tranquilizador (Nebout & Pirracchio, 2012).

2.2.3 Otras herramientas

La tonometría gástrica, valora la perfusión y oxigenación gastrointestinales, mediante la detección de acidosis en la pared de la mucosa gástrica. Esta acidosis se asocia con mayor mortalidad y con el fracaso orgánico múltiple. Esta técnica y la capnometría sublingual tienen una alta correlación en sus resultados. Pero existen dudas sobre la capacidad de estas técnicas de señalar problemas de hipoxia en tejidos y en patología séptica hace difícil concluir sobre el origen de esta acidosis (Baigorri-González & Lorente Balanza, 2005).

En algún lugar entre la detección directa de la hipoxia a nivel celular - ensayos enzimáticos, biomarcadores y análisis histopatológicos complejos - y los índices de hipoperfusión global - niveles de lactato, saturación venosa central ($ScvO_2$) y producción de orina - existe un método más práctico y menos costoso de determinación de oxigenación de tejidos (Loiacono & Shapiro, 2010).

2.3 Principios de detección óptica.

La espectroscopia¹ es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Tiene aplicaciones en medicina, biología, astronomía, física y química entre otras. Sus bases se remontan a los estudios que hizo a principios del siglo XVIII, William Herschel cuando descubre la radiación infrarroja a través de experimentos con prismas y termómetros (Lima & Bakker, 2011). Desde esta época las técnicas usadas y las aplicaciones han crecido geoméricamente siendo uno de los campos más activos de investigación en varias ciencias (Blanco & Villarroya, 2002).

El uso de la espectroscopia del infrarrojo cercano – NIRS - encuentra muchísimas aplicaciones en campos tan diversos como el control de calidad en la industria farmacéutica o el control de procesos en la industria química. En el campo de las ciencias de la vida, esta técnica encuentra aplicaciones que son aprobadas por diversas asociaciones como el análisis de alimentos, por ejemplo en la determinación del nivel de humedad y de proteínas en los cereales (Siesler, Ozaki, Kawata, & Heise, 2002).

Su aplicación en la ciencia médica ha sido lenta, en parte por las bajas concentraciones de los analitos estudiados por esta y por la gran capacidad de absorción que tiene el agua, usualmente el mayor componente de las muestras de bio-fluidos. Recientemente las mejoras en la instrumentación NIRS han permitido mejorar la reproducibilidad de las medidas y el arribo de técnicas para extraer señales cuando la relación señal/ruido es muy baja ha permitido mejorar la consistencia de los resultados (Yeganeh et al., 2012).

La alternativa ofrecida por la espectroscopia NIRS para la detección de la oxigenación tisular tiene un sustento científico importante y con unas bases sólidas. El trabajo disciplinado de muchos científicos ha llevado esta técnica a los niveles en que se encuentra hoy, muy cercanos a una aplicación clínica definitiva.

2.3.1 Espectro Electromagnético.

El espectro electromagnético tienen un rango desde los rayos γ (10^{-4} - 10^{-1} nm) pasando por las microondas (1 mm hasta 100 cm, la longitud de onda más larga) hasta las ondas de radio que pueden tener longitudes en el rango de los km (Serway & Jewett, 2008). La energía radiante presta una sensación visible al ojo humano en el rango espectral de 380 – 800 nm. El espectro por encima del rango visible es la zona conocida como el rango infrarrojo (700 – 2500 nm), que son fácilmente absorbidas por la mayor parte de los materiales (Maikala, 2010; Serway & Jewett, 2008). Mientras más larga sea la longitud de onda, menos energía lleva. El rango infrarrojo no es peligroso para los tejidos humanos.

El rango de radiación electromagnética (Figura 7) en el cual los tejidos son lo suficientemente poco absorbentes para que permitan algún nivel significativo de penetración de la luz se conoce como la ventana terapéutica y se encuentra entre las longitudes de onda en el rango de (600 – 1300) nm (Lu & Fei, 2014; Vo-Dinh, 2003).

¹ La Real Academia Española acepta la ortografía de la palabra espectroscopia con y sin acento, aunque su uso más común al hablar intuye el acento, para esta tesis se usa la ortografía primaria de la palabra, sin tilde.

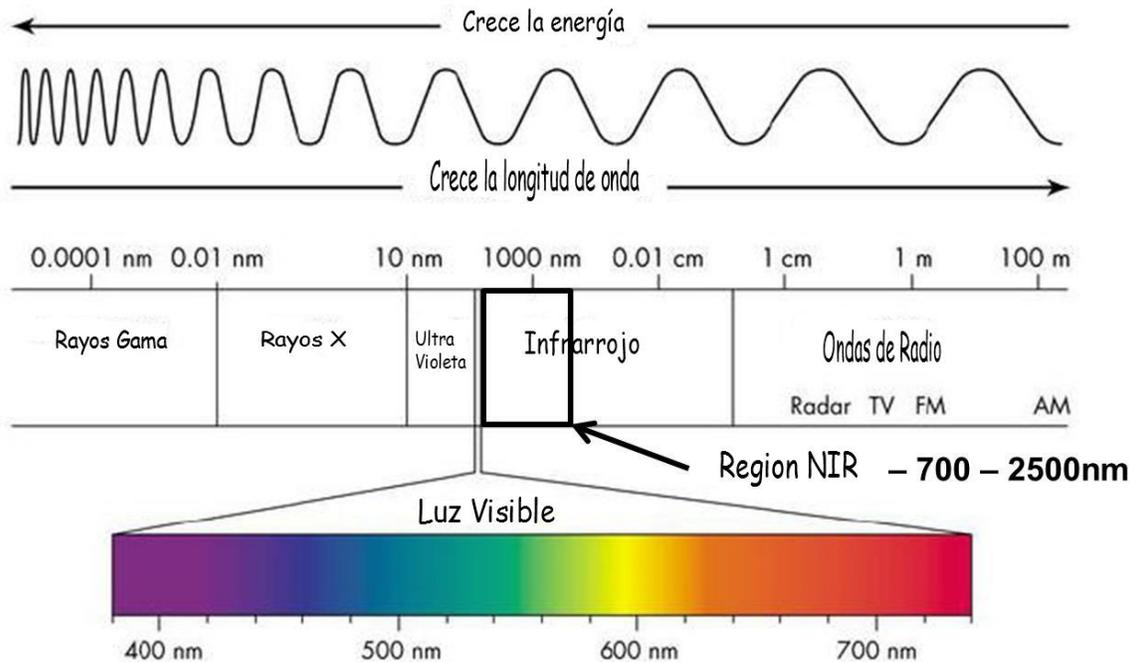


Figura 7 Espectro de radiación electromagnética, con la región infrarroja destacada. La ventana terapéutica es un rango dentro del NIR que está entre 600-1300 nm.

2.3.2 Transmisión de la luz en tejidos

Cuando diferentes longitudes de onda chocan con la materia, la transmisión de la luz típicamente depende de una combinación de absorción, dispersión y reflexión. La absorción es la pérdida de fotones y resulta en transiciones de estados energéticos en la molécula absorbente (v.g. Cromóforo). Esta radiación absorbida típicamente es convertida en calor, y la cantidad de energía transformada, conocida como potencia de absorción, es expresada como una fracción de la energía de la luz incidente en la materia (Maikala, 2010). La parte de la luz incidente reflejada es conocida como reflexión, y resulta cuando la luz es dispersada en la dirección opuesta a la luz incidente. La dispersión es definida como la parte de la energía radiante (luz) que choca con una dirección definida en la materia, que es alterada (v.g. Dispersada) en todas las direcciones debido a los límites del índice de refracción.

En el rango de la ventana terapéutica, cuando la luz atraviesa tejidos, el efecto de la dispersión es mayor a la absorción, por lo que la luz que se propaga se torna en radiación difusa (Zonios & Dimou, 2009). Esta condición se describe en la literatura como el régimen de difusión de la luz donde el coeficiente de absorción es mucho menor que el coeficiente de dispersión.

Se ha demostrado que la caída en la intensidad de penetración de la luz en tejido ocurre en dos etapas. La primera es muy rápida a medida que el haz de luz colimado es convertido en un haz difuso por efecto de la dispersión del medio (tejido). La segunda etapa ocurre a pocos milímetros de profundidad y ocurre con menor rapidez porque la dispersión no atenúa el haz difuso tan fuertemente y la absorción hecha por los cromóforos (Ver sección 2.4.1 más adelante) se convierte

en una parte más significativa de la atenuación total. (Cope & Delpy, 1988) El camino promedio recorrido por la luz es fuertemente afectado de forma no lineal por variaciones de los índices de absorción y dispersión del tejido sondeado.

Existen dos modalidades de medida, la que toma la luz transmitida a través de un volumen determinado de tejido (transmitancia) o aquella reflejada por el mismo tejido (reflectancia). En el primer caso, dependiendo de la zona que se quiera medir, la atenuación del haz puede ser muy alta y en tal caso se dificulta su lectura. Para lograr lecturas confiables puede ser necesario incrementar la intensidad del haz incidente, lo que en algunos casos puede significar que la luz puede hacer daños en el tejido (Cysewska-Sobusiak, 2001). En el caso de las medidas en reflectancia, la atenuación de la luz es menor a consecuencia de un recorrido promedio menor de la luz.

En espectroscopia in vivo se busca establecer la relación de *cambio* de la atenuación medida con el *cambio* en la absorción. (D T Delpy et al., 1988) En este caso el cambio de atenuación medido nos permite conocer los cambios en concentración de un cromóforo determinado en el volumen que se está analizando. Dicho cambio en concentración genera un cambio en la absorción de la luz.

2.3.3 Principios de cuantificación especies moleculares en tejidos.

El principio fundamental de la detección espectroscópica es la atenuación. Un rayo incidente de luz sufre una atenuación a su paso por una muestra.

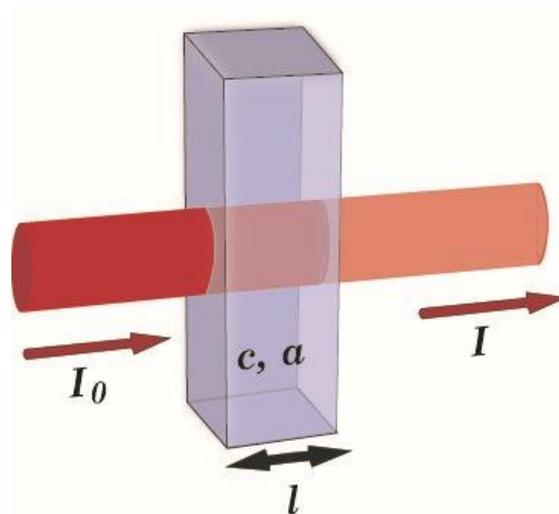


Figura 8 Principio de la Ley de Lambert-Bouguer. Diagrama: Daniel Gallego González

En términos de cuantificación, un paso muy importante fue el descubrimiento hecho por el matemático Francés Bouger de la que se conoce como ley de Lambert-Bouger, en 1729.

$$\text{Absorbancia} = A = -\log \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad 1 \quad [DO]^2$$

² La densidad óptica de un medio transparente es una medida de su índice de refracción. Un medio con un índice de refracción relativamente alto tiene una densidad óptica elevada, mientras que un medio con un índice bajo tiene una densidad óptica baja (Jenkins & White, 2001).

Donde:

I_0 es la intensidad del haz incidente.

I es la intensidad después de la interacción con la muestra.

En 1852, Beer derivó una relación similar, relacionando un número de moléculas en una solución que absorben la radiación incidente. Relaciona la concentración de una sustancia absorbente disuelta en un medio no-absorbente (Cope, 1991):

$$A = \alpha \cdot l \cdot c \quad 2$$

La ley de Beer-Lambert relaciona la absorbancia A linealmente con la concentración molar (c) de una sustancia y la absorptividad molar (α) – también conocido como el coeficiente de extinción del compuesto -y la distancia (l). De esta ecuación se puede extraer la concentración de una sustancia, cuando se conocen su índice de absorptividad molar y la distancia del camino de la luz en la muestra, siempre y cuando dicha sustancia sea la única que presente absorción en dicha muestra.

Esta ley solo es válida en medios que no produzcan dispersión y por lo tanto no puede ser aplicado a tejido biológico. Solo relativamente hace poco, la ley modificada de Beer-Lambert fue propuesta por el Británico Delpy en 1988. (D T Delpy et al., 1988) que toma en cuenta la dispersión de la luz en el tejido.

$$A = (\alpha \cdot c \cdot L \cdot B) + G \quad 3 \quad [DO]$$

Donde B es un factor de longitud de trayectoria α es el coeficiente de absorción [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$], c es la concentración [μM], L es la distancia entre fuente y detector, y G es un factor desconocido dependiente de la geometría. Si se conocen α , L y B siempre que G permanezca constante, los cambios en la concentración de los cromóforos pueden ser calculados de los cambios en la absorbancia con la fórmula:

$$\Delta c = \Delta A / (\alpha \cdot L \cdot B) \quad 4 \quad [\mu\text{M}]$$

Uso de la relación de Beer-Lambert solo es posible si la longitud de trayectoria B permanece constante durante las medidas. Para tener medidas ciertas de este parámetro se utilizan técnicas optoelectrónicas para medir el tiempo que le toma a un pulso corto de luz infrarroja viajar a través de una extensión determinada de tejido. De la velocidad de la luz y el índice de refracción del tejido, es posible determinar la longitud de trayectoria media que siguen los fotones en el tejido y por lo tanto determinar el factor B . En el caso de medidas cerebrales hechas en neonatos, para un diámetro típico de 6 cm la trayectoria media fue de 26.4 cm. (Wyatt et al., 1990)

Los tejidos contienen diferentes cromóforos que absorben la luz. La absorbancia total de la luz incidente en una longitud de onda determinada se puede calcular como la suma de las contribuciones de cada cromóforo:

$$A = [\alpha_1 c_1 + \alpha_2 c_2 + \alpha_3 c_3 + \dots + \alpha_n c_n] d \quad 5 \quad [DO]$$

Existen varios cromóforos absorbentes en medidas tomadas con NIRS que contribuyen a la atenuación total, como agua, lípidos, melanina, mioglobina, oxi-hemoglobina (O2Hb), deoxi-hemoglobina (HHb) y citocromo oxidasa, entre otros (Pellicer & Bravo, 2011). Estos cromóforos presentan diferentes espectros de absorción, lo que permite su detección espectroscópica al usar diferentes longitudes de onda.

2.3.4 Mediciones experimentales

Para realizar medidas cuantitativas se debe calcular la reflectancia $R(\lambda)$ de las medidas tomadas con el espectroscopio,

$$R(\lambda) = \log_{10} \left(\frac{\text{espectro}_{\lambda} - \text{oscuro}_{\lambda}}{\text{referencia}_{\lambda} - \text{oscuro}_{\lambda}} \right) \quad 6$$

Cada una de las medidas espectrales para obtener la reflectancia, contiene el espectro de intensidades registradas por el instrumento, para cada caso, así:

- Espectro λ se refiere al espectro medido.
- Oscuro λ : Es el espectro que se puede obtener con la fuente apagada.
- Referencia λ : Es el espectro que se obtiene cuando no existe tejido entre las sondas.

2.4 Especies moleculares y su detección por medios ópticos

De las técnicas actualmente investigadas para evaluación de oxigenación de tejidos (Sakr, 2010) para uso en ambiente clínico, la espectroscopia NIR es una de las técnicas no invasivas disponibles que permite conocer la disponibilidad del oxígeno en los tejidos y evaluar su capacidad metabólica y vitalidad. Su campo de desarrollo más destacado es el de estudios de activación cerebral (M Ferrari & Quaresima, 2012). Se ha usado la técnica NIRS por muchos años como una herramienta de investigación primordialmente, pero cada año que pasa su posición como herramienta clínica crece (Wolf, Naulaers, van Bel, Kleiser, & Griesen, 2012).

2.4.1 Cromóforos

Los componentes de las moléculas que absorben la luz, son llamados cromóforos y por lo tanto otorgan el color de los materiales. La sangre y la melanina son ejemplos de compuestos que incluyen cromóforos que absorben la luz en el rango de longitudes de onda visibles y que se encuentran en los tejidos (Jacques, 2013). Además, encontramos tres pigmentos que contribuyen al color de la piel: Melanina, Hemoglobina oxigenada (rojo) y hemoglobina reducida (Azul) (Riesz, 2007). El cromóforo responsable de la mayor absorción en el rango infrarrojo es el agua, por lo cual es un elemento que debe ser considerado en las mediciones.

Una observación básica permite establecer que el color de la sangre arterial tiene un rojo vivo a diferencia del color oscuro de la sangre venosa. Al incidir sobre la sangre, la luz reflejada tiene el color rojo característico que dependiendo del contenido de oxígeno puede ser más oscuro o más brillante. Cuando la sangre tiene un contenido menor de oxígeno (caso de la sangre venosa) absorbe mayor cantidad de luz - principalmente en la longitud de onda del rojo - lo que le confiere el color oscuro reflejado que vemos. Clínicamente se puede detectar problemas de oxigenación de tejidos

examinando los pacientes por signos de cianosis, condición que se puede observar cuando los lechos ungueales cambian a un color azulado-morado característico (Pole, 2002).

La hemoglobina es la molécula responsable del color rojo característico, su afinidad por el oxígeno la hace el vehículo favorito para su transporte (Horecker, 1942). Los cromóforos existen en los tejidos en concentraciones fijas (como el agua) o variables (Hemoglobina). En los tejidos se encuentran una variedad amplia de cromóforos (Figura 9). Estos cromóforos tienen una huella característica que se conoce como espectro específico de absorción que tiene características (picos) particulares en cada longitud de onda y para cada cromóforo. Los picos en un espectro de absorción específica son como huellas digitales que ayudan en su detección.

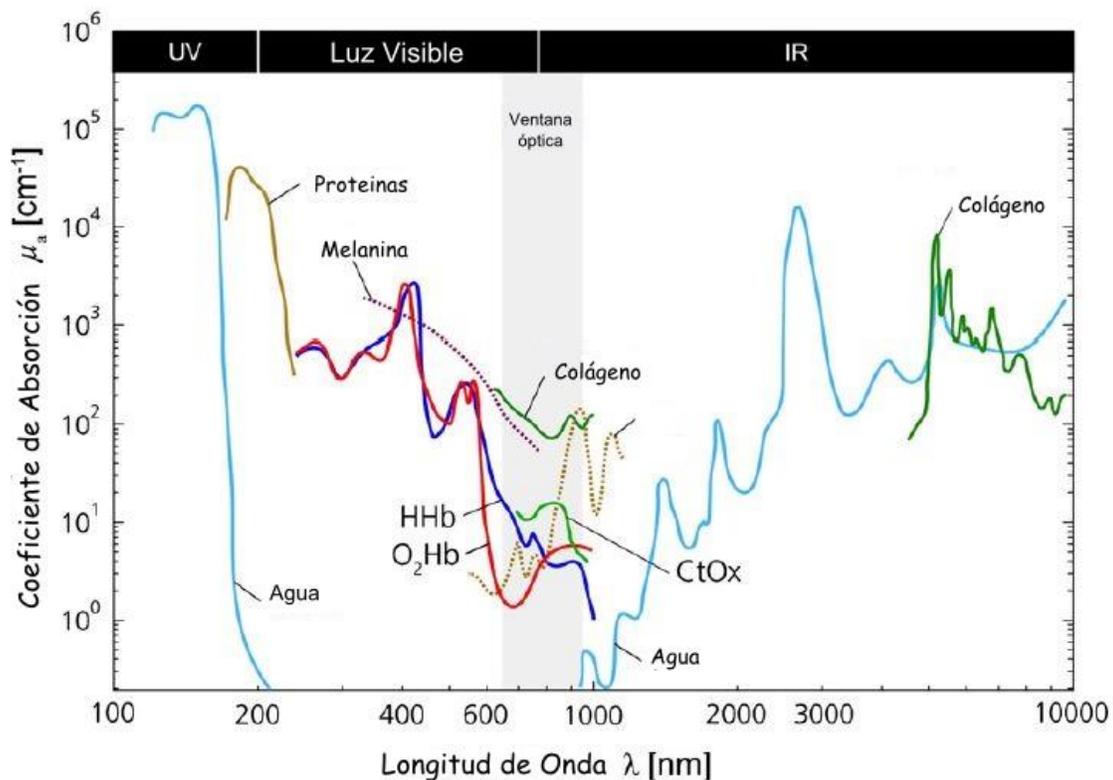


Figura 9 Espectros de absorción (en base logaritmo natural) para diferentes cromóforos que se encuentran en tejidos humanos. Tomada de (Scholkmann et al., 2014)

2.4.2 Mioglobina y Melanina

La mioglobina es otro pigmento importante en el transporte del oxígeno hacia los tejidos (Ver 2.1.1 más atrás). Existe un debate sobre la contribución de la mioglobina al espectro in-vivo tomado de los músculos. Algunos autores dicen que es insignificante, aunque algunos otros hacen esfuerzos por determinar su concentración absoluta in-vivo (Marcinek, Amara, Matz, Conley, & Schenkman, 2007). Otros simplifican su tratamiento al considerarla parte del mismo componente de la ecuación de suministro de oxígeno (DO₂) (Ryan, Erickson, Brizendine, Young, & McCully, 2012)

La Melanina es un pigmento con características de absorción interesantes que se encuentra en la epidermis. Tiene un efecto en la reflectancia de la luz en la piel; la reflectancia de la luz de una piel

negra es del orden de 50% de la de la piel blanca en el rango de 600-1000 nm, lo que sugiere que la transmisión de la luz se disminuiría en el mismo orden (Cope, 1991). Esto significa que la atenuación causada por la melanina requeriría una sensibilidad mayor del instrumento, ya que la absorción es constante y no depende de la oxigenación. En la Figura 9 se puede observar que el efecto de absorción de la luz por parte de la melanina disminuye a medida que aumenta la longitud de onda y que este efecto desaparece inclusive en parte de la ventana óptica. Podemos entonces contar con que el efecto de la melanina no es marcado en los espectros de absorción en tejidos en el rango del infrarrojo cercano.

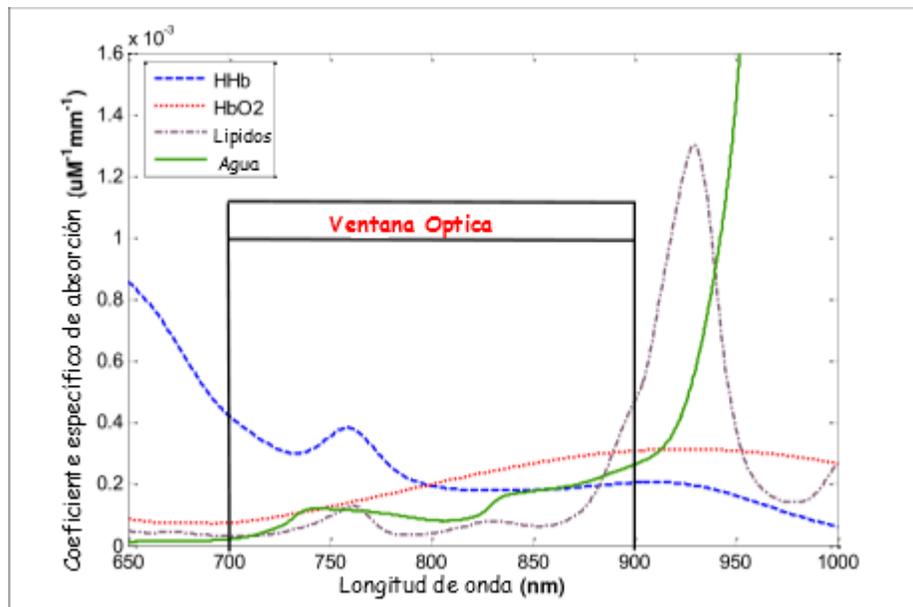


Figura 10 Espectro Específico de Absorción de los cromóforos de interés en oxigenación de tejidos. Se destaca la ventana óptica, región del espectro infrarrojo donde la penetración de la luz en tejidos es mayor, por la minimización de la absorción del agua. Tomado de (Toronov, 2015)

2.4.3 Cuantificación de Cromóforos

La espectroscopia NIR hace uso del trabajo desarrollado por la quimiometría en la detección de elementos constituyentes en muestras y su cuantificación. En esta rama de la ciencia química, NIRS ha probado ser una técnica versátil y rápida, con mínimos problemas en preparación de muestras, que entrega espectros rápidamente y permite identificar y medir a partir de un solo espectro (Blanco & Villarroja, 2002).

Para cuantificar cromóforos mediante espectroscopia del infrarrojo cercano se comienza por identificar las características cualitativas de los diferentes elementos presentes en una muestra o en el elemento que se quiere analizar. Esto significa que primero debe realizarse un análisis cualitativo específico (característica por unidad de masa) representado por el espectro específico de cada cromóforo. Este análisis permite una identificación única.

Así, en el caso de la HbO₂ se pueden distinguir características que son propias de su trazo espectral. En la Figura 10 Se puede ver las características distintivas de los trazos de los diferentes cromóforos importantes en la oxigenación de los tejidos. En el caso de la desoxi-hemoglobina es característico la joroba alrededor de los 760 nm. Así se construye una “librería” de referencia para el siguiente

paso, que es la cuantificación. De esta forma es posible comparar un espectro desconocido con el espectro específico y correlacionarlo hasta lograr su identificación (Blanco & Villarroya, 2002). Este es uno de los pasos más importantes en la cuantificación de los cromóforos y el principal en el algoritmo de cuantificación. La descripción completa del algoritmo se encuentra en el numeral 4.2.6.

2.4.4 Cuantificación del metabolismo mitocondrial

Mediante NIRS, es posible cuantificar las variantes oxigenadas (HbO_2) y desoxigenadas (Hb) de la hemoglobina presente en los tejidos. También es posible detectar un cromóforo, el citocromo, parte del complejo enzimático presente en la membrana de la mitocondria, responsable de más del 90% de la generación del ATP, al participar en el mecanismo de fosforilación oxidativa (Barret et al., 2010). El oxígeno es la molécula que facilita las reacciones de óxido-reducción al generar un gradiente electroquímico de protones que participa en la producción del ATP (Amara et al., 2008). En el complejo enzimático final, también conocido como Citocromo C oxidasa (CCO) (Malatesta, Antonini, Sarti, & Brunori, 1995; Richter & Ludwig, 2003), se producen las últimas reacciones al donar electrones que permiten reducir el oxígeno produciendo moléculas de agua. Al verificar el estado de óxido-reducción del CCO, se puede verificar el aprovechamiento del oxígeno en los tejidos (Berg et al., 2002).

La estructura del CCO se caracteriza por contener 4 centros metálicos activos de óxido-reducción (redox), dos grupos hemo y dos cobre. Mediante métodos espectroscópicos se ha caracterizado su estado redox, y las particularidades morfológicas que permiten cumplir su función (Michel, Behr, Harrenga, & Kannt, 1998). El CCO se reduce rápidamente cuando el oxígeno no está disponible, de esta manera al monitorear su estado redox se puede establecer el funcionamiento adecuado del metabolismo oxidativo en el tejido estudiado (Steven G. Simonson & Piantadosi, 1996).

Mientras para el caso de la hemoglobina, la absorbancia depende de su grado de oxigenación en el del citocromo la espectroscopia detecta cambios en el estado redox de la molécula (Cooper & Springett, 1997). Los cambios en la concentración del Citocromo son mucho más lentos (días) que los cambios en las variantes de la hemoglobina (puede ser en cuestión de segundos) (Cooper et al., 1997).

La dificultad de la detección del CCO radica en varios aspectos. Por un lado aun cuando la absorbancia específica es muy alta (la más alta de los cromóforos estudiados en seguimiento al oxígeno) la concentración del citocromo es menos del 10% de la correspondiente concentración de hemoglobina (Cooper & Springett, 1997; D. Delpy & Cope, 1997). Por otro lado, existen dudas respecto a la naturaleza química de los estadios intermedios asociados a las reacciones protónicas. Dos de sus formas estables son los catalizadores intermedios Peróxido (P) y Ferrilo (F) (Rich, 2003). Como consecuencia los espectros específicos de estos catalizadores intermedios no están adecuadamente caracterizados y por lo tanto la interpretación de los datos obtenidos in-vivo puede llevar a confusiones (Mason, Nicholls, & Cooper, 2014).

El papel del CCO en la disfunción mitocondrial ha sido validado en estudios con primates (Fink, 2002; S G Simonson et al., 1994). En ellos se estableció mediante NIRS como la velocidad en las reacciones de óxido-reducción cambia a medida que evoluciona el estado de sepsis.

2.5 Instrumentación

El siguiente componente determinante de la espectroscopia es la instrumentación. Este es un campo muy amplio, por lo tanto se ha hecho un esfuerzo por mostrar de forma resumida todas las modalidades disponibles en la aplicación de la técnica.

2.5.1 Espectroscopia

El término espectroscopia define un número grande de técnicas que usan la radiación para obtener información de una estructura y las propiedades de la materia. El principio básico que comparten todas las técnicas espectroscópicas es iluminar con un haz de radiación electromagnética una muestra, y observar su respuesta al estímulo. La respuesta se recoge usualmente como una función de la longitud de onda de la radiación. Un trazo de la respuesta como una función de la longitud de onda se conoce como un espectro. (Nonell & Viappiani, 2015)

2.5.2 Instrumentos de Dominio de Tiempo

Generalmente son costosos y de gran tamaño. Su principio básico de funcionamiento está basado en el uso de un láser pulsado que es activado en un tiempo supremamente corto. Un sistema de registro puede detectar la intensidad de la luz y calcular el tiempo entre la emisión del pulso y la recepción de la señal de retorno (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Un pulso se parte en dos, uno es dirigido directamente a la cámara electrónica y el otro viaja a través del tejido. Los principios básicos para aplicaciones en mediciones en oxigenación de tejidos se comenzaron a investigar a finales de los años 80 del siglo XX (D T Delpy et al., 1988), donde se estudió la difusión de la luz en tejidos, mediante simulaciones (MonteCarlo), en patrones ópticos (Phantoms) y finalmente en animales. Se encontró que la trayectoria promedio de la luz es igual a 4.3 veces la distancia fuente-detector.

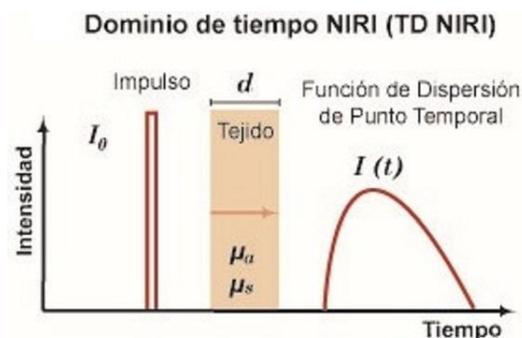


Figura 11 Principio físico instrumentación dominio de Tiempo. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)

Para estos sistemas es fácil verificar el parámetro de desplazamiento de la luz B en las ecuaciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

$$B = \frac{DP}{\rho} = \frac{c_v \cdot t}{\rho \cdot n_t} \quad 7 \quad [cm]$$

Donde c_v es la velocidad de la luz en el vacío, n_t es el índice de refracción de la luz en tejidos y ρ es la distancia fuente-detector.

2.5.3 Instrumentos de Dominio-Frecuencia

Estos instrumentos modulan una fuente continua de laser en un set de frecuencias dadas y miden el cambio de fase entre la luz que se emite y la que se recibe.

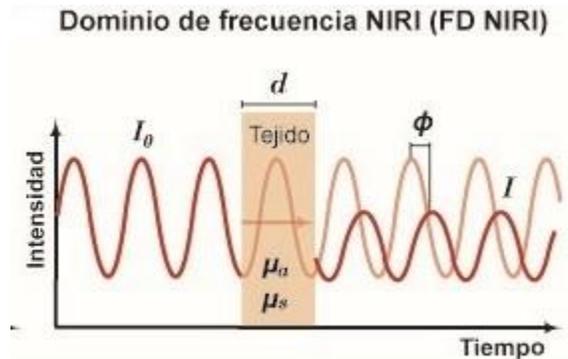


Figura 12 Principio físico instrumentación Dominio de Frecuencia. Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)

Para este caso el parámetro B de las ecuaciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se calcula de la siguiente manera:

$$B = \frac{\phi c_v}{(2\pi f n_t \rho)} \quad \delta \quad [cm]$$

Donde

Φ es el desplazamiento de fase.

F es la frecuencia de modulación de la luz.

ρ distancia fuente-detector

2.5.4 Instrumentos de onda continua

La mayoría de la instrumentación usada en investigación y práctica clínica son instrumentos de onda continua NIRS que usan la ley de Beer-Lambert -Ecuación **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** - para calcular cambios en la concentración de los diferentes cromóforos (Pellicer & Bravo, 2011). La mayoría de estos instrumentos utilizan un número limitado de longitudes de onda (3-5) para resolver cambios de concentraciones de igual número de cromóforos **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

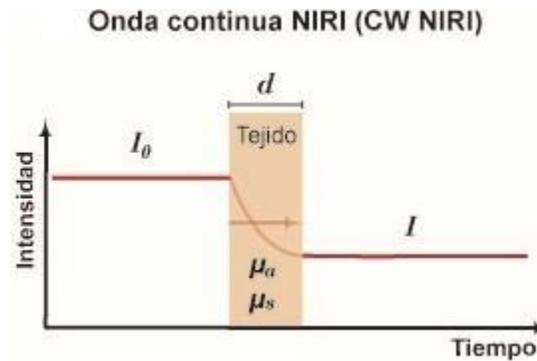


Figura 13 Principio físico de detección de cambios de concentración en cromóforos con equipos de Onda Continua.
Adaptado de (Scholkmann et al., 2014)

2.5.5 Instrumentos de Banda Ancha - Onda Continua

En este tipo de instrumentación se toma una fuente que emite luz en el rango de 600 nm – 1000 nm y se procesa la forma de la frecuencia de la luz recibida, que cambia de acuerdo a las concentraciones de cromóforos encontrados en los tejidos. El tipo de instrumentación puede ser similar a la usada en onda continua excepto que la fuente tiene un ancho de banda mayor (Bale, Mitra, Meek, Robertson, & Tachtsidis, 2014). También puede ser combinado con el método de Dominio –Tiempo para calcular el factor de distancia B de las ecuaciones **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

2.5.5.1 Requerimientos de un sistema NIRS

NIRS se presenta entonces como una herramienta para el seguimiento de la hipoxia a nivel celular (Loiacono & Shapiro, 2010). Para derivar medidas de seguimiento del aprovechamiento del oxígeno a nivel tisular se requiere una instrumentación con capacidad de detectar cambios en concentración de cromóforos muy pequeños. Esto impone medir el comportamiento de las enzimas responsables del aprovechamiento del oxígeno ha sido el objetivo de la ciencia desde que Jobsis (Jobsis, 1977) planteó la posibilidad de medir el comportamiento de óxido reducción de las enzimas que participan de la oxidación fosforilativa en la mitocondria. De hecho Jobsis planteó el Citocromo a, a_3 , como el objetivo para seguimiento a la cadena respiratoria. Luego del uso final en la cadena de electrones del oxígeno en el conocido complejo IV, el resultado final es agua.

2.5.5.2 Consideraciones sobre intensidad y precisión

Para tejido cerebral, en la región de 700-1300 nm, la pérdida de intensidad es de aproximadamente un orden de magnitud por centímetro (una densidad óptica DO por centímetro). Esto se incrementa en longitudes de onda más cortas a tres DO por cm, en 514 nm.

A modo de referencia en la sensibilidad del instrumento necesaria para aplicaciones en tejido cerebral los cambios en absorción debidos a la Hemoglobina y al Citocromo a, a_3 están en el orden de 0,1 DO/cm para el primero y 0.07 DO/cm en el caso del citocromo. (D T Delpy et al., 1988)

2.5.5.3 Consideraciones sobre un algoritmo de cuantificación

El análisis de la señal espectral de tejidos in-vivo entregada por un instrumento espectroscópico permite encontrar concentraciones de los diferentes cromóforos. La decodificación de estas señales

para conseguir las medidas se hace mediante manipulaciones matemáticas (Ver sección 1.3.3), que se consignan en un algoritmo de procesamiento de señales digitales. La naturaleza de dicho algoritmo y el nivel de complejidad varía significativamente (Scholkmann et al., 2014). Se utilizó la ecuación de Beer-Lambert, que permite obtener la concentración de una sustancia a partir de la atenuación de un haz de luz que incide sobre ella. Para sistemas complejos como los biológicos esta ecuación pierde validez y se requiere un nivel de modelación matemática más complejo que considere todos los efectos del transporte de la luz en los tejidos, lo que hace dispendiosos los cálculos (Sergio Fantini, Franceschini, & Gratton, 1994; Jacques & Pogue, 2008; Kienle & Patterson, 1997).

No todos los algoritmos presentados por investigadores o proveedores de equipos reciben un escrutinio de pares, se hace necesario entonces establecer puntos de comparación y poder hacer una revisión de resultados desde una perspectiva común (Cooper & Springett, 1997; Matcher, Elwell, Cooper, Cope, & Delpy, 1995).

2.5.5.4 Soporte o brazaletes NIRS

Un problema interesante y poco estudiado es el posicionamiento de las sondas ópticas emisor-receptos en los sitios anatómicos designados para el estudio. Los parámetros para considerar su solución son la estabilidad óptica que impida los artefactos en las medidas, la comodidad del paciente y la facilidad de su aplicación

El papel de un soporte es permitir una rápida intervención del paciente por parte del personal médico, ejerciendo su función con comodidad y al mismo tiempo garantizando estabilidad en las mediciones, que evite artefactos de movimiento.

En estudios previos se han logrado montajes que permiten la toma de medidas en ambientes experimentales (David T Delpy, 1999; S Fantini et al., 1999). En un ambiente clínico y con pacientes reales no es posible contar con el tiempo y las facilidades necesarias para hacer un montaje complejo. Por tal motivo es necesario estudiar soluciones prácticas; en el caso de la monitorización cerebral puede ser difíciles de encontrar (Kassab, 2014). Los fabricantes de equipos han logrado disminuir el tamaño de las sondas mediante fibras ópticas pequeñas y arreglos múltiples (Ver **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)



Figura 14 Optodos comerciales, varios fabricantes. Aplicación en medidas cerebrales. Tomado de (Dix, van Bel, Baerts, & Lemmers, 2013; "NIRO 200 NX - Near Infrared Oxygenation Monitor: A highly functional tissue oxygenation monitor," 2015)

Por lo tanto las fibras necesarias deben tener un núcleo del mayor diámetro posible. Esto hace su sujeción y localización dificultosa. Una fibra óptica debe preservar una curvatura mínima o de otra manera puede resultar dañada ("Bend Radius & Mechanical," 2015).

Otra de las funciones importantes del soporte de las sondas es especificar las distancias entre la sonda de entrada y la de salida, este parámetro es importante en los cálculos de las concentraciones.

3 Estado del arte

3.1 Uso de sistema NIRS para monitorización del paciente crítico

Las aplicaciones clínicas del NIRS a la fecha no se aferran al uso regular. Todavía no es considerado como un estándar en los protocolos de tratamiento médico. Se ha usado con otros métodos diagnósticos como resonancia magnética y tomografía computarizada, complementando las mediciones que hacen estos sistemas, pero la complejidad de su uso no permite el uso rutinario (Hajime, 2013). La monitorización de oxigenación cerebral tiene mucha importancia en campos como el cuidado peri operatorio en cirugía cardíaca, (Scheeren, Schober, & Schwarte, 2012) y el cuidado del paciente neonato prematuro (Hyttel-Sørensen et al., 2013) y en ellos la técnica NIRS ya ha hecho un progreso significativo como herramienta clínica.

En aplicaciones clínicas para el paciente crítico los desarrollos son pocos. En el caso de la sepsis, Lipcsey y otros hicieron una revisión de resultados obtenidos en estudios NIRS para evaluar la eficacia tanto en el diagnóstico como pronóstico de la sepsis y encontraron que si no se usa una prueba de oclusión esta técnica no entrega resultados confiables ((Lipcsey et al., 2012). En la generación de parámetros dinámicos como concentraciones de HbO₂ se puede detectar cambios en las velocidades de reperfusión, indicando cambios en la microcirculación. ¿Pero qué se puede decir de la monitorización del CCO en tejidos, biomarcador del metabolismo tisular?

Mayevsky y otros han logrado progresos en monitorización de lo que ellos denominan parámetros de vitalidad de tejidos, usando el estado redox del NADH, mediante espectroscopia de fluorescencia (A Mayevsky & Pewzner, 2007). Este es el primer sistema encontrado que permite estudiar la función mitocondrial in-vivo, pero para hacerlo debe usarse la técnica de forma invasiva, al necesitar acceso al tejido de la pared uretral (Avraham Mayevsky et al., 2011). El tejido cerebral es muy sensible a la falta de oxígeno, por lo que la monitorización del metabolismo cerebral focaliza la atención de los investigadores. En estudios hechos por Bale y otros en pacientes neonatos la monitorización mediante CCO, demostraron que trazos de Hb y CCO pueden ser consideradas como variables no acopladas, esto es, encontraron que son parámetros independientes (Bale et al., 2014). Esto demuestra su validez como biomarcador del metabolismo cerebral. ¿Puede ser esto logrado en tejidos distintos al tejido cerebral?

3.2 Resumen e hipótesis de esta tesis

El diagnóstico y pronóstico clínico de la sepsis requiere herramientas más ágiles y confiables. La espectroscopia del infrarrojo cercano NIRS se presenta como una opción relevante ya que tiene como gran ventaja su carácter no invasivo.

Lo cual lleva a plantear la siguiente pregunta de investigación:

- ¿Cuáles son las condiciones técnicas y clínicas que permiten establecer medidas de oxigenación de tejidos periféricos mediante espectroscopia del infrarrojo cercano y utilizar dichas medidas para hacer diagnóstico y pronóstico del paciente crítico con sepsis?
- En particular se pretende establecer las condiciones, equipos y análisis de datos necesarios para obtener medidas que permitan hacer seguimiento a la oxigenación de tejidos. Las

variantes de la Hemoglobina oxigenada (HbO₂), desoxigenada (HHb) así como el estado redox de Citocromo oxidasa (CCO) la cadena enzimática responsable final en el ciclo de respiración celular. ¿Se pueden determinar estos parámetros como variables independientes entre sí?

4 Materiales y Métodos

Para cumplir con el objetivo general trazado por esta tesis: *Evaluar el nivel de oxigenación en tejido muscular humano in-vivo mediante métodos ópticos no invasivos, a través de la cuantificación de especies moleculares asociadas a la respiración celular*; en este capítulo se presentan cada una de las herramientas utilizadas para cumplir este objetivo, así como las metodologías empleadas. La implementación de un sistema (hardware y software) utilizado para la toma de medidas tanto en ambientes controlados de experimentación con voluntarios sanos, así como los protocolos clínicos implementados con pacientes de sepsis en estado crítico.

4.1 Instrumentación

La primera fase de este trabajo consistió en la búsqueda de dispositivos comerciales o experimentales (con grupos de investigación internacionales) capaces de registrar las medidas de oxigenación en tejidos, tales como concentración de hemoglobina oxigenada, indicadores de un nivel adecuado de entrega de oxígeno a los tejidos (DO₂). Adicionalmente, se requería que el equipo permitiera obtener medidas del aprovechamiento del oxígeno en los tejidos (VO₂), mediante verificación del metabolismo celular y mitocondrial.

La Tabla 1 muestra un *benchmarking* de algunos de los equipos que miden oximetría de tejidos, disponibles comercialmente al momento de este estudio. Existen una variedad amplia de equipos desarrollados para aplicaciones clínicas (Marco Ferrari & Quaresima, 2012); sin embargo, no existe una oferta comercial de equipos que permita medir el metabolismo de oxígeno de forma no invasiva.

Empresa	País	Equipo	Especies moleculares medidas	Estado de tecnología	Invasivo
Critisense	Israel	CritiSense	Hemoglobina, NADH	Comercial	Si
Hamamatsu	Japón	NIRO 200NX	Hemoglobina	Comercial	No
Covidien	EUA	INVOS	Hemoglobina	Comercial	No

Empresa	País	Equipo	Especies moleculares medidas	Estado de tecnología	Invasivo
ISS	EUA	Oxiplex	Hemoglobina	Comercial	No
Hutchinson	EUA	In Spectra	Hemoglobina	Comercial	No

Tabla 1 Resumen de algunos equipos disponibles comercialmente que miden oxigenación de tejidos, considerados inicialmente para los propósitos del proyecto.

La oferta comercial de equipos que hacen uso de la tecnología NIRS para el seguimiento de oxigenación de tejidos, y los estudios realizados con estos, han mostrado un marcado incremento (Boas, Elwell, Ferrari, & Taga, 2014; Elwell & Cooper, 2011; Marco Ferrari, Muthalib, & Quaresima, 2011; Moerman & Wouters, 2010; Scholkmann et al., 2014; Wariar, Gaffke, Haller, & Bertocci, 2000).

El interés de los fabricantes por demostrar su relevancia clínica se refleja en un gran número de ensayos clínicos, lamentablemente limitados en su alcance; como lo evidencia una lista de las publicaciones hechas con el equipo Niro facilitada por el fabricante (Hamamatsu) la mayoría de los estudios recientes han sido realizados en el campo de Neurología (30%), Neonatología (20%), Músculo (24%), Cardiología, Cuidado Crítico y estudios fisiológicos musculares (Hamamatsu, 2012).

4.1.1 Consideraciones sobre la instrumentación

Al no ser posible disponer de un sistema integrado que provea medidas de metabolismo mitocondrial de forma no invasiva, fue necesario recurrir a la comunidad científica que trabaja en estos desarrollos. Fue claro en estos contactos, que sería necesario incorporar equipos y algoritmos experimentales que permitieran extraer los parámetros buscados.

Para el caso de la instrumentación necesaria para el desarrollo de la medida para este proyecto se determinó mediante estos contactos que instrumentos de Banda-Ancha, Onda Continua proveen la mejor respuesta y tienen un costo relativamente bajo. Este tipo de instrumentación comúnmente se desarrolla a partir de partes especificadas para el propósito y con un objetivo específico (Yeganeh et al., 2012). Pero dada la disponibilidad de equipos espectrofotométricos comerciales con buenas características es una ruta directa para estas mediciones. En un estudio hecho por Diop y otros, que pretendía establecer si un espectroscopio comercial puede reemplazar un espectroscopio hecho a la medida en estudios NIRS, se describe como usando espectros de calibración con una fuente Mercurio-Argón, se demuestra un grado de precisión espectral alto con respecto al instrumento desarrollado especialmente. Además el tipo de mediciones hechas fueron más estrechas alrededor de las características espectrales particulares (Diop, Wright, Toronov, Lee, & St Lawrence, 2014).

Las ventajas de la selección de un equipo como estos son evidentes cuando se considera que el diseño de un equipo hecho a la medida es un tema complejo, que demanda mucho conocimiento de instrumentación espectroscópica, por fuera del alcance de este trabajo.

4.1.2 Componentes del sistema

El equipo usado está integrado por varios componentes, descritos a continuación (Ver Figura 15).

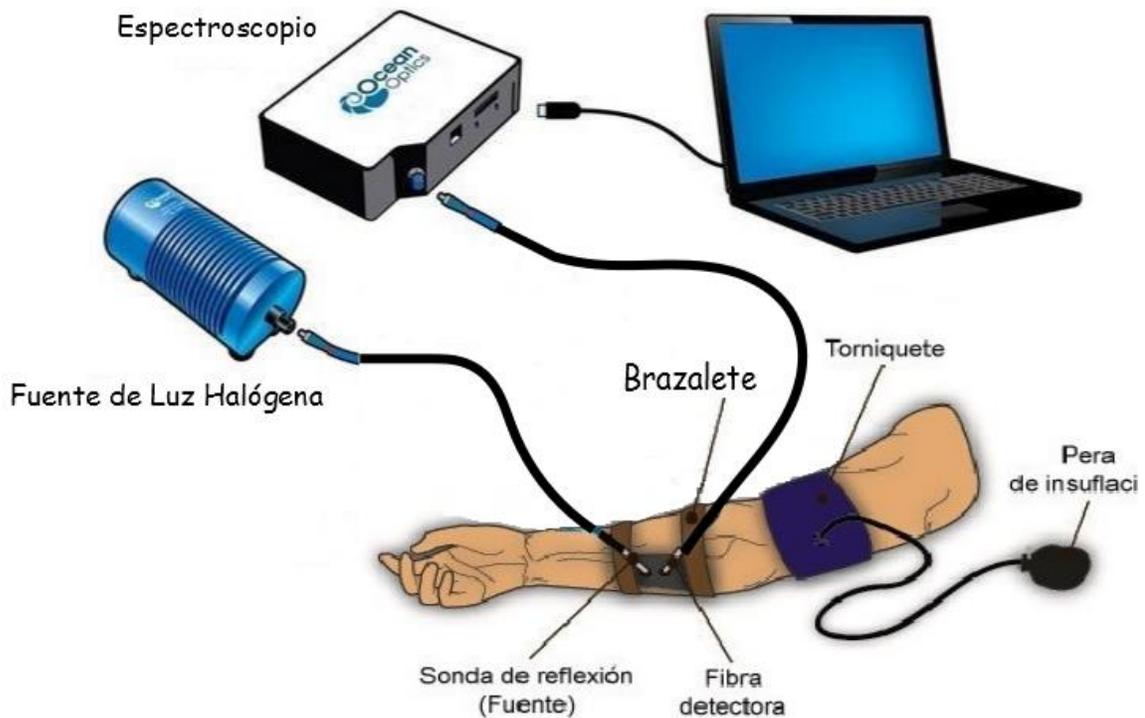


Figura 15 Sistema NIR integrado, que permitió hacer tomas de espectros experimentales y clínicos

Tabla 2 Características técnicas del espectroscopio Ocean Optics QE65Pro

4.1.2.1 Espectroscopio

Este es un equipo comercial suministrado por la casa Ocean Optics (“Ocean Optics,” 2015). Este espectroscopio fue modificado por el fabricante, a petición del grupo de investigación, optimizando el rango espectral correspondiente al infrarrojo cercano, específicamente 625 nm a 930 nm. Presenta una gran sensibilidad a bajas condiciones de luz en aplicaciones de luz difusa, como las de espectroscopia de tejidos.

Un resumen de las características del instrumento usado puede verse en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, extracto de la ficha técnica suministrada por el fabricante (“QE65 Pro Data Sheet,” 2015)

Especificaciones	Cantidades
Dimensiones Físicas: Longitud x Ancho x Altura	182 mm x 110 mm x 47 mm
Espectrómetro: Diseño Conector de fibra de entrada Rejilla de Dispersión Rendija de entrada Rango Espectral Eficiencia Cuántica Profundidad de pozo Corriente de Oscuridad	Czerny-Turner cruzado simétrico. Conector SMA 905 fibra óptica de una hebra (0.22 NA) Rejilla No. 4, rango NIR. 200 μm x 1 mm de altura. 625 – 930 nm 90% Pixel Indiv. : 300K electrones; Pozo: \sim 1.5M electrones 4000 e/pixel/s. (típico) @ 25° C; 200 e/pixel/s. (típico) @ 0° C
Espectroscopio: Tiempo de Integración Señal a ruido	8ms – 15 minutos 1000:1 para cada adquisición

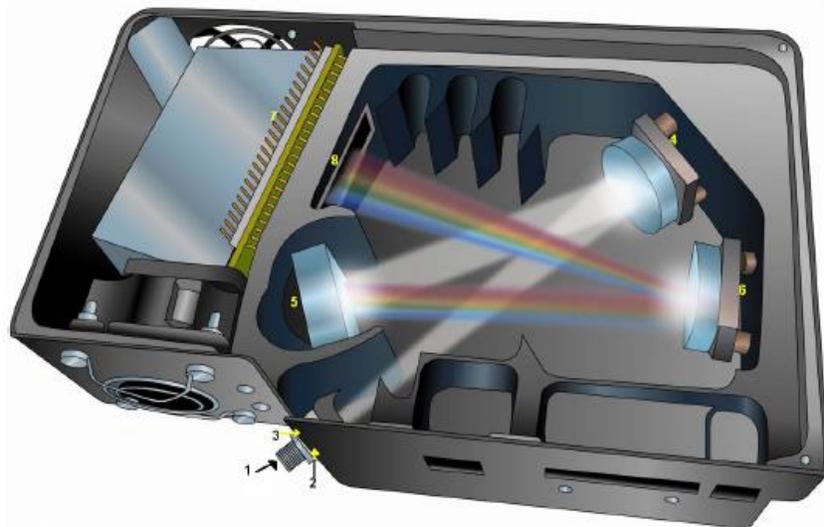


Figura 16 La luz de retorno se recibe en el instrumento a través de la hendidura de entrada (1). A continuación, una ranura intercambiable regula la cantidad de luz que entra al instrumento y controla la resolución espectral. Un filtro (3) enseguida asegura que la radiación que entra al instrumento esté en el rango espectral determinado. Un espejo colimador (4) enfoca la luz que entra para que incida sobre la rejilla de refracción, que la separa en los componentes espectrales que la componen. Finalmente la radiación que proviene de la rejilla de refracción se enfoca mediante un espejo (6) al detector (8). Fuente ("Ocean Optics," 2015)

La hendidura ayuda a producir imágenes estrechas, (

Figura 16) de manera que las imágenes de los espectros no se superpongan. (Jenkins & White, 2001)

4.1.2.2 Fibras ópticas

Las fibras ópticas inicialmente utilizadas fueron las suministradas por el fabricante, Ocean Optics. Estas fibras tenían un núcleo de 113 μm que no tenían suficiente capacidad de transporte de luz. Fueron reemplazadas por unas fibras con un diámetro de núcleo mayor de aproximadamente 3.18 mm con una entrega superior de energía, tomadas del catálogo de la compañía Dolan Jenner (“Dolan - Jenner,” 2015).

4.1.2.3 Soporte de las fibras ópticas

La miniaturización de sondas ha permitido la integración de sistemas de NIRS en algunos ambientes clínicos. Esto no siempre es posible en equipos de banda-ancha, onda-continua. En este tipo de equipos la cantidad de luz que llega al equipo es crucial para el análisis en las diferentes longitudes de onda.

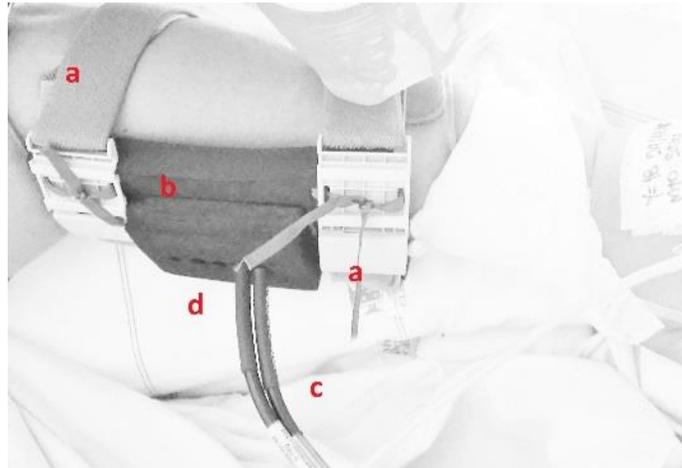


Figura 17 Brazalete de antebrazo. a) Sujetadores auto ajustables al contorno del brazo con adhesivo velcro, b) bloque material EVA negro, para evitar entrada de luz externa, c) fibras emisión-detección, d) agujeros espaciados en tramos de 10 mm.

4.1.2.4 Fuente de Luz

Se usó una fuente Ocean Optics con una potencia de 20 W, dicha potencia hace referencia a la generada por la lámpara sin elementos de transporte de luz; sin embargo, la potencia de entrega a la salida de la fibra óptica es inferior, según se describe en la Tabla 3.

Especificaciones de Ingeniería	HL- 2000 -HP- FHSA
Fuente :	Tungsteno halógeno.
Longitud de onda Rango:	360-2400 nm
Potencia nominal:	20 W

Potencia de salida típica:	8,4 mW
Tiempo de calentamiento :	+ 10 minutos

Tabla 3 Características de la fuente de luz.

4.1.3 Volumen sondeado

El instrumento obtiene un espectro global del volumen estudiado, un trazo espectral que representa la atenuación de la energía total entregada por la fibra o sonda de iluminación. Este espectro tiene una forma característica y supone que su composición es la suma de todos los componentes que provocan atenuación (Figura 18).

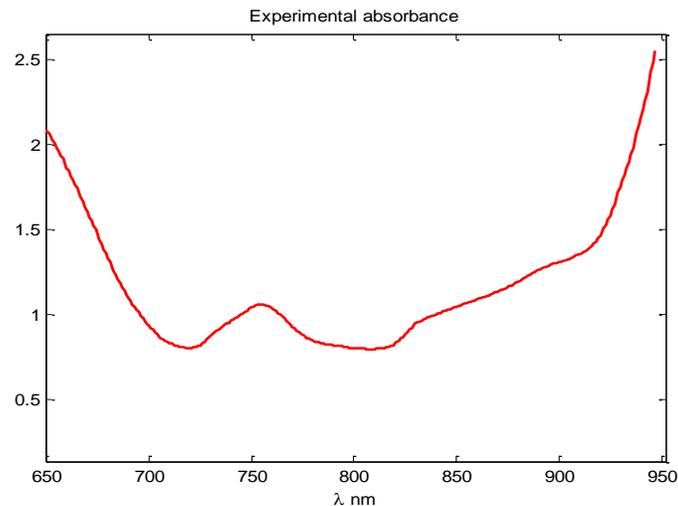


Figura 18 Espectro base entregado por espectroscopio en medidas de oxigenación de tejidos (fuente: ("Professor Vladislav Toronov," 2015).

La distancia a la cual se disponga las sondas fuente-receptor en el tejido determina la distancia a la que penetra la luz o radiación infrarroja. El camino que recorre la luz desde la fuente hasta el sensor se ha descrito como un arco semiesférico (Murkin & Arango, 2009). Se puede pensar en términos más coloquiales en la forma de un banano. Figura 19.

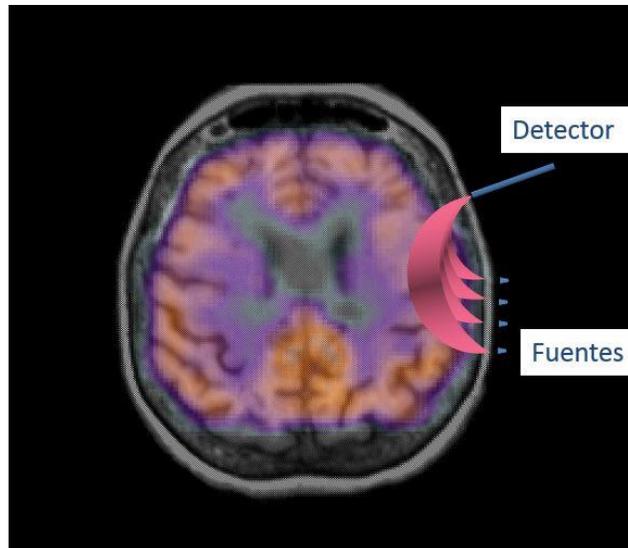


Figura 19. La penetración de la luz dependerá de la distancia entre el par fuente-detector (Fuente: ("Professor Vladislav Toronov," 2015).

La penetración alcanzada puede ser entre $1/3$ (Murkin & Arango, 2009) y $1/2$ (Pellicer & Bravo, 2011) de la distancia entre el par fuente-detector.

4.1.4 Características del sistema de espectroscopia de tejidos en medidas en tejidos

Integrado el sistema tiene un comportamiento definido por la combinación de todos sus componentes. Dado que es un sistema integrado por componentes de diverso origen, la respuesta característica medida es necesaria para determinar las características de las medidas experimentales y clínicas.

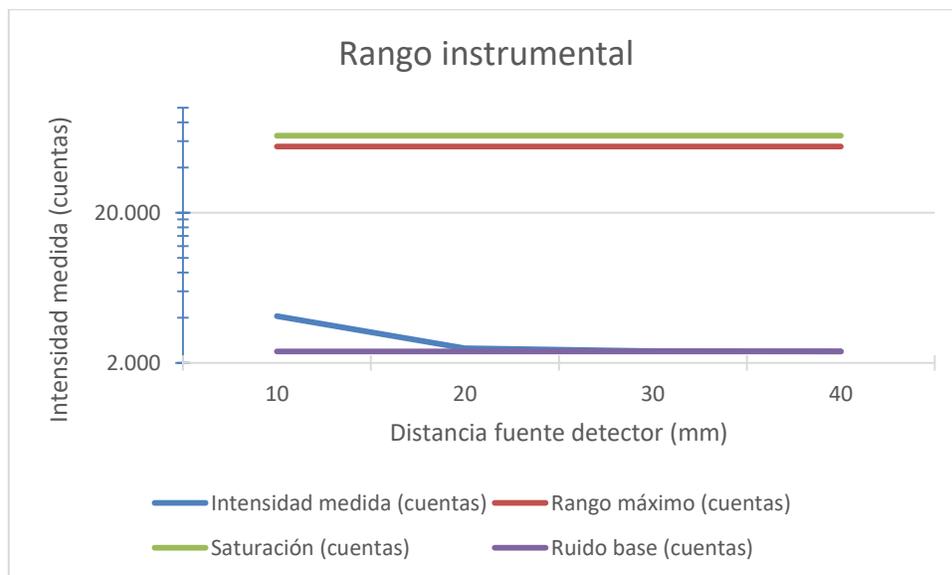


Figura 20 Características del sistema en tomas de medidas experimentales in-vivo en antebrazo. Tiempo de integración, 100 ms, promedio de escaneo de 1 y ancho de furgón de 0. Los valores mostrados corresponden al pico máximo de la curva cruda espectral en tejido en antebrazo alrededor de 800 nm.

El máximo número de cuentas obtenido en un montaje experimental en antebrazo, se logra con la máxima apertura del obturador mecánico de la fuente y corresponde a unas 4100 cuentas @800 nm. Para este mismo montaje en una medida normal, se pudo observar una variación del máximo número de cuentas @800 nm de 300 nm en la intensidad medida (3600-3300 nm) lo que da una idea de la variabilidad de la medida con el movimiento, que se puede nombrar como artefacto de movimiento.

4.2 Toma de medidas NIRS

Para obtener medidas de atenuación de luz el sistema suministra de forma digital señales para ser procesadas. Las señales antes del proceso se conocen como espectros crudos (en inglés se usa comúnmente *raw data*). Para cumplir dicho propósito, el equipo es suministrado por el fabricante con un software basado en Windows (también funciona en otros sistemas operativos como Linux y OSX) para obtener medidas espectrales (absorbancia, reflectancia, emisión e irradiancia) y permitir la toma de medidas espectrales de varias maneras. También permite hacer análisis básicos de datos de espectroscopia, como suma y resta de señales o integración y diferenciación entre datos espectrales.

Spectrasuite permite operar y recibir datos de un espectroscopio conectado a través del puerto USB del computador en el cual esté instalado (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). A través de su ventana de adquisición de datos se puede obtener una visualización de forma numérica



Figura 21 Ventana de visualización de *Spectrasuite*

o gráfica de los espectros.

El software *Spectrasuite* recopila la información espectral y la convierte en un archivo de datos tipo .txt. Permite recoger datos por un periodo limitado de tiempo o por un determinado número de escaneos del espectro. Los datos espectrales se pueden observar en tiempo real y hacer ajustes a las condiciones de toma de medidas.

4.2.1 Parámetros de adquisición

Para la captura de datos se selecciona la opción de *High-Speed Acquisition* (Ctrl.- H). En esta opción del software se pueden adquirir datos a una gran velocidad, importante cuando de adquisición de grandes volúmenes de datos como los que se están recopilando en este estudio.

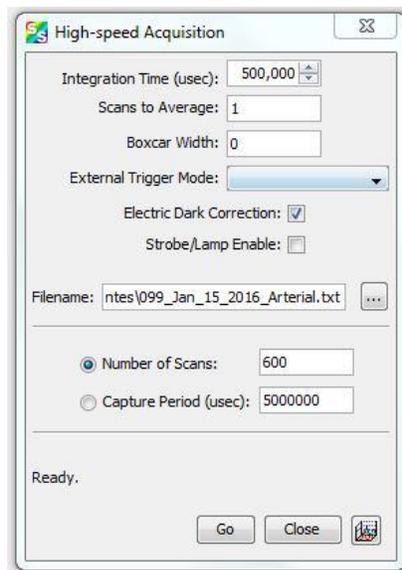


Figura 22: Cuadro de adquisición rápida.

4.2.1.1 Tiempo de integración (Integration Time):

Permite manipular la intensidad de la señal; debe procurarse no superar el límite de saturación del instrumento, que en el caso del espectroscopio QE65Pro es ~65 000 cuentas. Una buena medida es nunca superar, el 85% de este valor de saturación, o sea mantenerse por debajo de las 55 000 cuentas. En general con el sistema dispuesto para esta investigación nunca se superaron las 10 000 cuentas en medidas in-vivo, así que esta condición se cumple. En el caso de las medidas que se hacen con el sistema, se utilizó un tiempo de 500 000 μ s (0.5 s), suficiente para permitir una mayor cantidad de luz en el detector que garantice una medida confiable para poder hacer el análisis respectivo.

4.2.1.2 Promedio de Scan (Scans to Average)

Este parámetro configura el instrumento para tomar un número determinado de escaneos del detector para promediarlos antes de entregarlos al convertidor A/D para ser registrados como señal digital. En las medidas se utilizó 1, ya que el QE65Pro tiene una relación señal/ruido lo suficientemente alta que hace innecesario eliminar ruido de forma adicional de la señal.

4.2.1.3 Promedio de Boxcar:

Es el número de píxeles en el detector que se promedian, antes de enviar la información al convertidor A/D. Este parámetro se configuró en cero, de nuevo por las razones expuestas en el parámetro anterior.

Los dos parámetros anteriores son formas efectivas de mejorar la relación señal/ruido. Cada una tiene su desventaja; en el caso de Promediar escaneos, el tiempo que se tarde la toma de datos puede ser superior. En el caso del Promedio de *Boxcar* si se especifica un parámetro muy alto, se hace a costa de la resolución espectral, y en estos casos es posible perder características espectrales que identifican las señales.

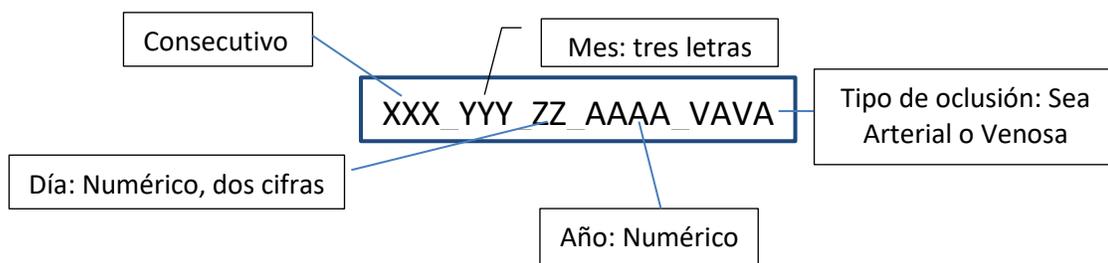
4.2.1.4 Corrección de Luz oscura (Electric Dark Correction)

El ruido conocido como ruido de disparo (*shot noise*) es un ruido propio de los detectores de luz, en este caso CCD (Diop et al., 2014). El espectroscopio QE65Pro provee la posibilidad de disminuir el ruido propio del detector, mediante 24 pixeles bloqueados que son promediados en cada toma de medida. Al escoger esta opción se resta del espectro el valor de base que tiene el detector, por su naturaleza opto-eléctrica.

4.2.1.5 Número de escaneos (Number of Scans)

Este parámetro dependerá del tiempo que se requiera monitorear al paciente. Si son 5 minutos de monitoreo (toma de medidas) y suponiendo un tiempo de integración de 0.5 s, se deben tomar 600 escaneos para llegar a completar la medida. Alternativamente se puede escoger el tiempo directamente, que en el caso de 5 min equivalen a 5×10^6 segundos.

A continuación se debe seleccionar el directorio del disco del computador donde se guardará el archivo de datos y el nombre que se le va a dar. El orden en que se etiquetan los datos de esta investigación es:



Ejemplo:

`012_Dic_9_2015_Arterial`

4.2.1.6 Forma de la curva básica o “cruda”

El espectro crudo es el que se obtiene directamente al tomar las medidas en el sitio anatómico escogido. La forma característica de este espectro se puede ver en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Un archivo de datos se pueden registrar para el QE65Pro con el ancho espectral particular (625 – 930 nm) XXX medidas de intensidad en cada punto del espectro, entre 599 nm y 971 nm un total de 1044 registros discretos por cada espectro tomado. Para los cinco minutos de monitoreo, un archivo puede contener 630 mil registros individuales de intensidad.

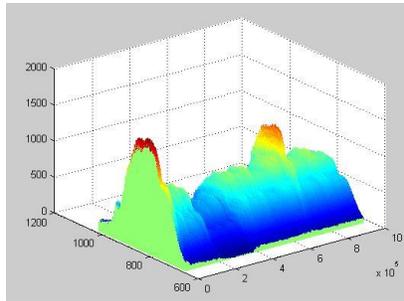


Figura 23 Toma de datos espectrales, en prueba de oclusión.

4.2.2 Localización anatómica

La técnica NIRS puede ser usada en múltiples localizaciones anatómicas, esta es una de sus ventajas. Aparte del gran volumen de investigación en mediciones NIRS en cerebro, se encuentran reportes en literatura sobre mediciones en musculatura periférica (extremidades) e inclusive en músculo masetero (Colin et al., 2012). Y aunque en teoría sea posible aplicarlo a cualquier área anatómica, se presentan diferencias significativas entre mediciones hechas sobre un mismo paciente en áreas diferentes de una misma extremidad, ver por ejemplo (Bezemer et al., 2009; Fellahi et al., 2014; Gómez et al., 2009).

Ante la imposibilidad - por lo menos por el momento - de monitorizar varios sitios anatómicos simultáneamente, la técnica NIRS busca efectuar predicciones globales partiendo de medidas locales. Un estudio encontrado en esta revisión del estado del arte, ha comparado la sensibilidad y la especificidad de algunos sitios anatómicos cuando se hacen pruebas diagnósticas o pronósticos con equipos NIRS encontrando que el músculo masetero es mejor predictor que sitios como el musculo deltoides o la eminencia tenar cuando se busca predecir la saturación venosa central (Colin et al., 2012). Cuando se trata de generar medidas dinámicas, sin embargo este sitio no es muy favorecido; las extremidades son sitios donde es fácil aplicar un torniquete para generar una oclusión venosa o arterial, con las cuales se puedan observar los parámetros de reperusión. Pero hay que tener en cuenta las diferencias en mediciones encontradas entre sitios, inclusive en una misma extremidad, como el caso de las diferencias entre medidas distales y proximales en extremidades inferiores (Fellahi et al., 2014). En el caso de las extremidades superiores se pueden ver las mismas diferencias entre medidas tomadas entre sitios favorecidos en muchos estudios, como eminencia tenar o antebrazo.

Las ventajas de elegir como sitio de mediciones la eminencia tenar pueden resumirse en varios aspectos: por un lado es un sitio fácilmente accesible, inclusive en pacientes postrados, con una constitución principalmente muscular y con un porcentaje de adiposidad bajo en los tejidos. Como desventaja como sitio anatómico presenta su facilidad de promover los artefactos por movimiento, al ser un sitio con mayor movilidad. Adicionalmente el diseño de un sistema para sostener fibras (fuente-detector) gruesas es complejo.

En el caso del antebrazo se puede decir que aunque quizás puede ser más difícil predecir el porcentaje de grasa que pueda tener esta área anatómica, generalmente no es un impedimento para mediciones ópticas. En estudios de composición en tejidos en deportistas se han usado técnicas NIR para estimar el porcentaje de adiposidad en el cuerpo, a partir de medidas hechas en bíceps (Stewart & Sutton, 2012). En otro estudio para evaluar capacidad mitocondrial, se usó la localización anatómica en extremidades inferiores, las medidas debieron ser corregidas para establecer el efecto

del tejido adiposo mediante una prueba de oclusión que permitiera obtener medidas base (Ryan et al., 2012). Este estudio utilizaba un algoritmo suministrado por el fabricante del equipo, que requiere este tipo de calibraciones. Sin embargo se ha hecho énfasis en tomar en cuenta el efecto de la adiposidad del tejido en las mediciones NIRS (Grieger, Geraskin, Steimers, & Kohl-Bareis, 2013). Van Beekvelt encontró un valor promedio de 3.7 mm (± 1.9 Desv. Est.) para la capa adiposa (van Beekvelt, Borghuis, van Engelen, Wevers, & Colier, 2001)

De las estructuras anatómicas encontradas durante el recorrido de la luz, estaría primariamente la piel, con su capa superior la epidermis, con múltiples estructuras entre ellas el recubrimiento superior que se conoce como stratum corneum (Siesler et al., 2002). La piel en general es la estructura que tiene el índice de refracción más alto de las estructuras anatómicas encontradas en el camino de la luz (Jacques, 2013). La profundidad a la cual se encuentra el final de la capa de piel puede ser de unos 75 μm (Sandby-Moller, Poulsen, & Wulf, 2003).

4.2.3 Generación de medidas dinámicas

El seguimiento de oxigenación de tejidos por medio de NIRS genera unos parámetros de cuantificación que pueden ser absolutos o relativos. Cuando se habla de cuantificación absoluta, se describe aquella medida cierta de un elemento en tejidos. En comparación la cuantificación relativa se refiere a cambios en medida con relación a otra medida de un tiempo anterior identificada como base.

La cuantificación absoluta de cromóforos in-vivo, además de ser desafiante y compleja, puede ser difícil de lograr. Por un lado no se conocen a cabalidad las concentraciones de muchos cromóforos y en muchos casos la fisiología de su funcionamiento es desconocida. Por esta razón, concentraciones absolutas de cromóforos pueden no tener significado clínico, al menos no actualmente.

Para generar parámetros clínicos que puedan aprovecharse diversos investigadores se han referido a los resultados obtenidos por grupos de fisiólogos experimentales (Marco Ferrari et al., 2011). El test de oclusión vascular transitoria (TOV) ha sido utilizado por varios investigadores en conjunto con la detección y cuantificación de cromóforos mediante NIRS (Bezemer et al., 2009; Gómez et al., 2008). Este tipo de pruebas pretende generar parámetros dinámicos que permitan estudiar el aprovechamiento del oxígeno en tejidos. En los resultados de varios estudios se verifica la hipótesis de cambio de pendiente de un trazo de seguimiento a un cromóforo, como predictor de sobrevivencia y Falla Orgánica Múltiple (Balestra, Legrand, & Ince, 2009). La detección se hace en la musculatura esquelética pues su carácter de órgano no vital la convierte en un potencial detector precoz de estados de hipoperfusión en paciente crítico (Gruartmoner, Mesquida, & Baigorri, 2013).

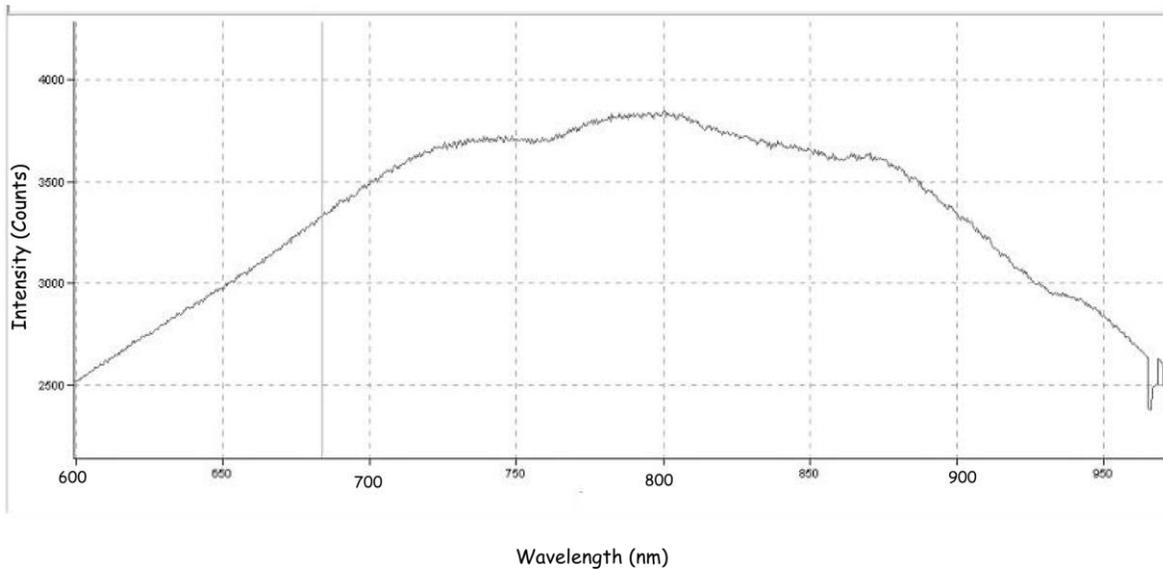


Figura 24 Ventana de Espectro: Eje abscisa, Longitud de onda (nm); Eje ordenadas, Intensidad (cuentas)

4.2.4 Espectros

Referencia: Este es el espectro que se toma con la fuente de luz encendida, pero sin muestra de entre la fuente y el receptor.

Oscuro: Es un espectro que toma el equipo con la luz bloqueada.

Espectro de datos: Espectro con la fuente encendida, y con toma de medidas en el sitio anatómico escogido (antebrazo) con las sondas respectivas de Fuente – Receptor.

4.2.5 Implementación del algoritmo

Con los datos crudos entregados por el espectroscopio se pueden encontrar las concentraciones de cada uno de los cromóforos de interés en el seguimiento a la oxigenación de tejidos. En esta investigación el componente médico y biológico del equipo interdisciplinario escogió los cromóforos de interés para medidas in-vivo experimentales y clínicas, la hemoglobina (oxigenada y desoxigenada) y el citocromo C oxidasa (CCO) para su seguimiento y análisis.

Cada dato es un registro de intensidad, en el tiempo y para una longitud de onda determinada. Para cada uno de estos datos, existe una combinación de concentraciones de cromóforos que hacen posible el nivel de atenuación, de un haz de luz que previamente ha sido dispersado por los tejidos. Un algoritmo para entregar datos de concentración a partir de datos de intensidades obtenidos por un espectroscopio, puede tener varias estrategias de decodificación a partir de los principios físicos expuestos en los numerales anteriores de esta tesis.

Para este trabajo se contó con el valioso aporte del profesor Dr. Vladislav Toronov (“Professor Vladislav Toronov,” 2015), Profesor Asociado del departamento de física de la Universidad de Ryerson, en Toronto, Canadá. El enfoque del trabajo del profesor Toronov y su equipo es en

imágenes ópticas y de resonancia magnética biomédicas. Gran parte de su trabajo tiene que ver con espectroscopia, mucho de este aplicado a medidas cerebrales.

El Dr. Toronov y su equipo desarrollaron un algoritmo para el seguimiento de especies moleculares asociadas al transporte y uso del oxígeno en tejidos, los principios físicos y matemáticos, se discuten a continuación. El uso de este algoritmo se realizó bajo acuerdo de confidencialidad. El equipo de investigación de la UPB, quién utilizó esta herramienta, no puede hacer público su contenido ni detalles (Ver Apéndice B).

El algoritmo utilizado tiene una ventaja muy importante, ha sido probado en condiciones experimentales (in vitro, y con patrones ópticos) (Yeganeh et al., 2012) y con animales (Nosrati et al., 2015). Las pruebas hechas con el algoritmo han arrojado resultados de concentración de cromóforos confirmadas con medidas hechas en los mismos sujetos experimentales mediante mediciones invasivas.

4.2.6 Descripción del algoritmo

Para cumplir con el objetivo: *Implementar los algoritmos de procesamiento de señales espectrales para obtener las medidas de concentración de cromóforos, in-vivo*, se implementa la aplicación de un algoritmo que permita obtener concentraciones de cromóforos a partir de señales crudas de absorbancia obtenidas del montaje propuesto anteriormente.

La estrategia de cuantificación del algoritmo Toronov es Beer-Lambert modificado.

- a. El algoritmo utiliza los siguientes insumos:
 - Archivo .txt con las mediciones de absorbancia tomadas del sujeto experimental.
 - Distancia Fuente-Detector, usada en la toma de medidas, en mm.
 - Concentraciones de Hemoglobina [HbO₂] y [HHb] que son empleados como valor inicial.³
 - Concentración de agua en tejidos aproximada, por ejemplo 70%.
 - Archivo de coeficientes de extinción de HbO₂, HHb, Agua, CCO en el rango del infrarrojo cercano (en el rango en el que se tomaron las medidas experimentales).

$\mu_s \lambda = M \lambda 800 - \alpha$ 22 Ver Apéndice C) parámetros M y α aproximados.

- c. Calcula absorbancia para cada λ con la ecuación 12 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

$$\psi = \frac{2}{(4\pi)^2} \frac{S}{D} \frac{\exp[-\rho(\mu_a)^{1/2}]}{\rho^3} \left[1 + \rho \left(\frac{\mu_a}{D} \right)^{1/2} \right] (Z_0 + Z_b) \left[z + 3D \left[1 - \frac{(Z_0 + Z_b)^2 + 3z^2}{2\rho^2} \left\{ 3 + \frac{\rho^2 \mu_a}{D} \right\} \right] \right]$$

- d. Ajuste de los datos de absorbancia calculados con la ecuación de difusión con los datos experimentales.

³ El algoritmo examinado como parte de la colaboración con el laboratorio del Profesor Toronov, permite calcular concentraciones absolutas de cromóforos, pero debe partir de aproximaciones iniciales. Para lograr concentraciones absolutas es necesario incluir un algoritmo de calibración que permite entregar al algoritmo concentraciones base de HbO₂ y HHb, para así poder calcular las concentraciones en los tejidos específicos de cada paciente. Este algoritmo de calibración no se encontró disponible cuando se realizó este trabajo, por lo tanto las concentraciones absolutas que entrega la versión actual del algoritmo son aproximaciones del valor real.

$$\ln \frac{\psi_{\lambda}(\mu_a + \Delta\mu_a, \mu_s)}{\psi_{\lambda}(\mu_a, \mu_s)} \xrightarrow{\text{Ajuste_No_Lineal}} \ln \frac{\text{Datos_Experimentales}(\lambda)}{\text{Datos_Experimentales}_0(\lambda)}$$

Ecuación 9

e. Calcula cambio en μ_a ($\Delta\mu_a$) en cada banda espectral

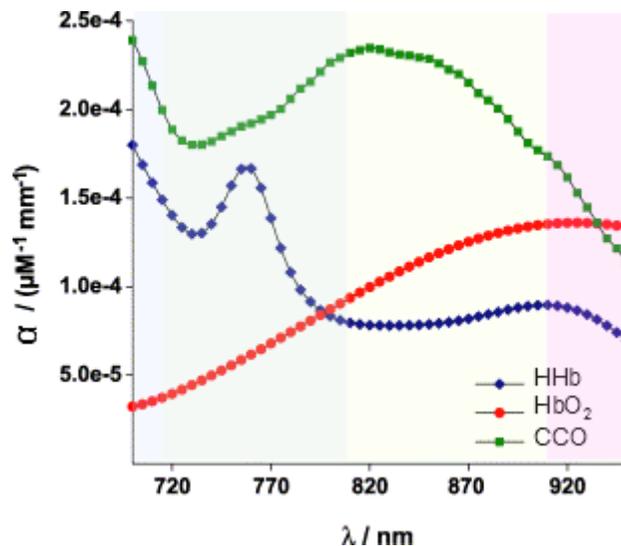


Figura 25 Espectros específicos de HbO₂, HHb y CCO. Bandas de longitud de onda para ajustar cada cromóforo como se describe en el texto.

- Para 700-800 nm. Cambios en concentración de HbO₂ y HHb
- Para rango espectral 900 – 1000 nm cambios en Agua
- Para rango espectral de 700 – 900 nm Cambios en CCO

f. Calcula cambios en la concentración de cada cromóforo (ΔC) a partir de $\Delta\mu_a$ usando la ecuación $\Delta c = \Delta A / (\alpha \cdot L \cdot B)$ 4, considerando únicamente los cambios en concentración, se puede obtener :

$$\Delta\mu_a = \sum \Delta[C] \alpha_{\lambda} \quad 10$$

Los resultados obtenidos en el monitoreo NIRS en voluntarios y pacientes puede ser visto mediante graficas que entrega el algoritmo Toronov.

El algoritmo entrega los parámetros medidos en forma gráfica (Figura 26), para mejor visualización.

4.2.7 Protocolos

A continuación se discuten los protocolos experimentales y clínicos, para cumplir el primero de los objetivos específicos trazados para este proyecto: *Diseñar e implementar los protocolos clínicos y técnicos para la adquisición de las señales espectrales dinámicas, in-vivo.*

4.2.7.1 Protocolo experimental

A continuación se describe las características del protocolo utilizado para realizar medidas de oxigenación tisular, tomadas en un voluntario sano, en antebrazo.

Distancia Fuente - Detector:18 mm	
Tiempo	Evento
00:00-00:55	Línea base
00:55-1:00	Oclusión a 130 mm Hg
1:00-6:00	Mantener Presión
6:00-8:00	Recuperación

Tabla 4 Protocolo y condiciones de medidas tomadas en voluntarios.

En los numerales siguientes se describe el comportamiento de las variables de resultado del procesamiento de los datos brutos con el algoritmo Toronov. Los datos básicos fueron suministrados por el laboratorio del profesor en Toronto, tomados en voluntarios sanos en antebrazo mediante un espectroscopio QE6500.

4.2.7.1.1 Resultados HbO₂ y HHb.

En la figura 26 se aprecia el comportamiento de la hemoglobina en los tejidos, durante una prueba de oclusión (Ver Tabla), y su asociación al oxígeno. En la variante oxigenada se ve el comportamiento de gradual descenso en la concentración. Simultáneamente se registra el incremento de la variante desoxigenada. Las unidades de concentración son micro-molar (μM)

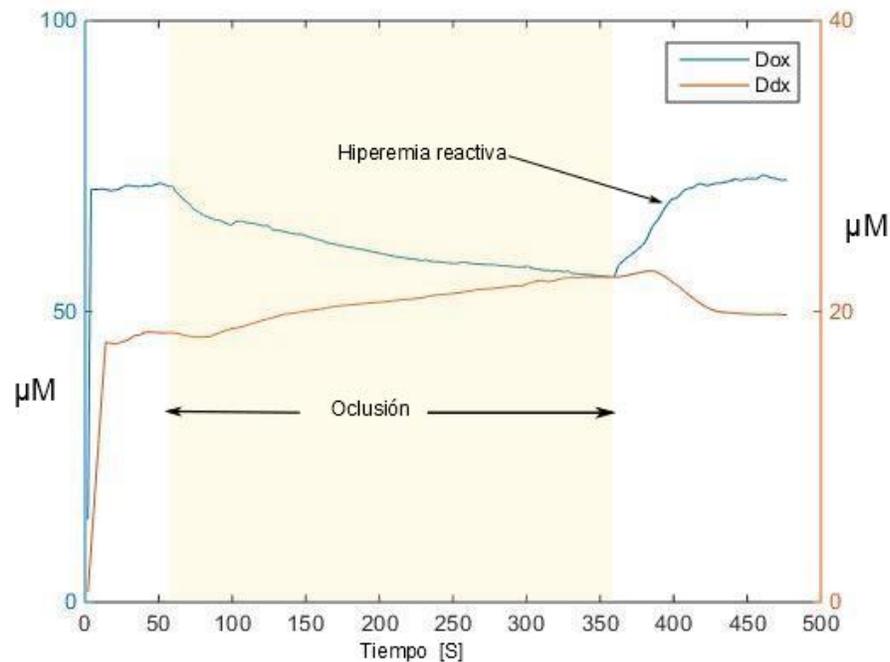


Figura 26 Concentración de cromóforos en prueba de oclusión. Dox es la medida de la Hemoglobina Oxigenada (HbO₂). Ddx es la medida de la hemoglobina desoxigenada (HHb). (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.)

4.2.7.1.2 Resultados de HbO₂ y CCO

Esta gráfica captura el comportamiento del CCO, tomando como punto de referencia el comportamiento de HbO₂ que es bien conocido en esta prueba. Es de observarse el hecho de que las escalas no son comparables, pero para efectos de ilustración del comportamiento del CCO, las escalas se modifican para coincidir. Cabe destacar el comportamiento ligeramente más lento al cambio para el citocromo con respecto al cambio de la hemoglobina, como se menciona en (Matcher et al., 1995).

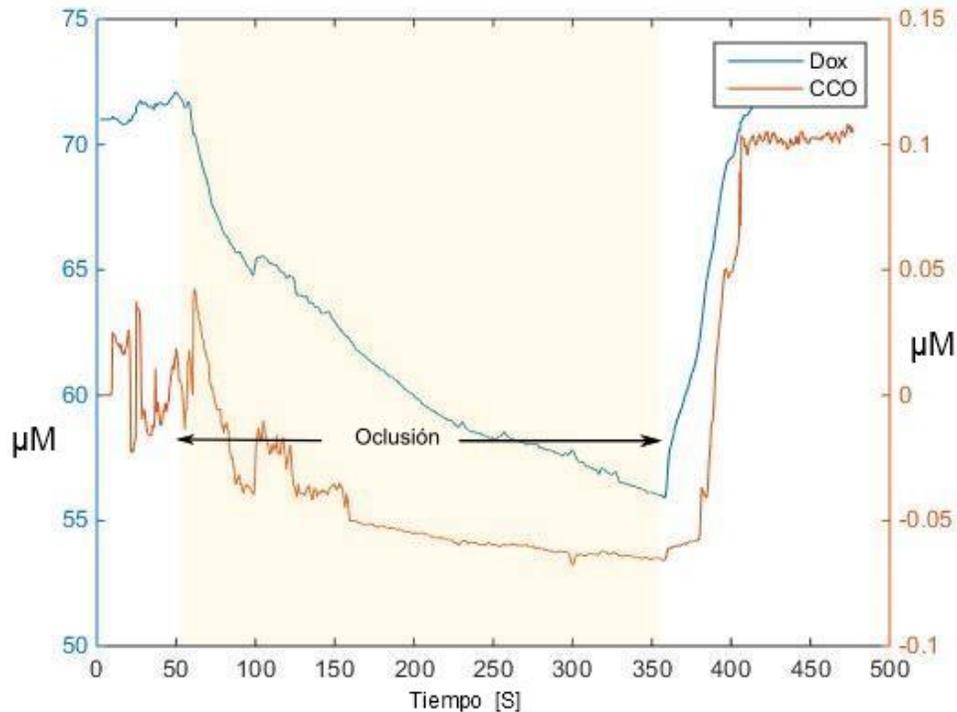


Figura 27 Registro de cromóforos en prueba de oclusión. HbO₂ vs. CCO, cada uno de estos trazos tiene su propia escala, ajustados para efectos de comparación. (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.)

4.2.7.1.3 Saturación y Hemoglobina total.

Mediante el seguimiento a parámetros de concentración de HbO₂ y HHb se pueden calcular parámetros como saturación de oxígeno, SO_2 . Este parámetro no tiene una notación estandarizada; algunos de los equipos disponibles entregan medidas de saturación de oxígeno en hemoglobina (SO_2) y algunas veces se presenta con unas siglas distintas, como S_tO_2 (t: tissue – en inglés) rSO_2 o S_rO_2 (r: Regional – saturación de un área específica) para diferenciarlo de las medidas encontradas en ambientes clínicos como S_pO_2 (p: pulse, proveniente de un pulso-oxímetro), S_aO_2 (a: arterial) que da un valor más global de saturación de hemoglobina a nivel de circulación arterial o S_vO_2 que especifica saturación venosa medida generalmente con un catéter de la arteria pulmonar. Algo parecido ocurre con los resultados de equipos de investigación trabajando en el tema, donde no hay un consenso sobre el desarrollo de estos parámetros o su verdadera utilidad clínica (Elwell & Cooper, 2011). En general este parámetro es calculado de la siguiente manera:

$$SO_2 = \frac{[HbO_2]}{[HbO_2] + [HHb]} \times 100\% \quad 11 \quad [\%]$$

Las pendientes de los trazos durante los eventos de oclusión y posterior recuperación representan el consumo (VO_2) y oferta (DO_2) de oxígeno a los tejidos. En estudios de fisiología muscular la técnica NIRS ha sido un gran apoyo cuando se trata de establecer con claridad cuál es la dinámica del metabolismo muscular (Marco Ferrari et al., 2011). Una mayor pendiente de de-saturación implica un consumo energético mayor a nivel muscular. Una pendiente de recuperación mayor, implicaría un suministro de O_2 mayor que el consumo mitocondrial y por tanto el consumo energético.

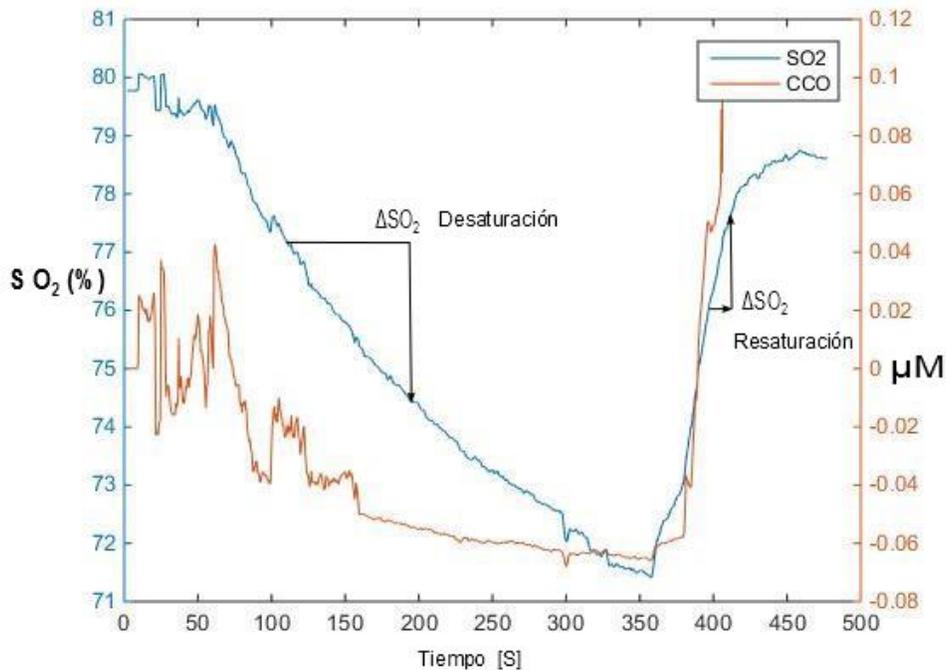


Figura 28 Trazo de Saturación de oxígeno en tejidos, acompañado de un trazo de actividad redox de CCO. Las pendientes de de-saturación y re-saturación representan el balance de entrega DO_2 y consumo VO_2 de O_2 . (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.)

Otros parámetros que pueden ser calculados a partir de concentraciones en pueden ser la Hemoglobina total (tHb) que puede ser calculada de la siguiente manera:

$$tHb = HbO_2 + HHb \quad 12 \quad [\%]$$

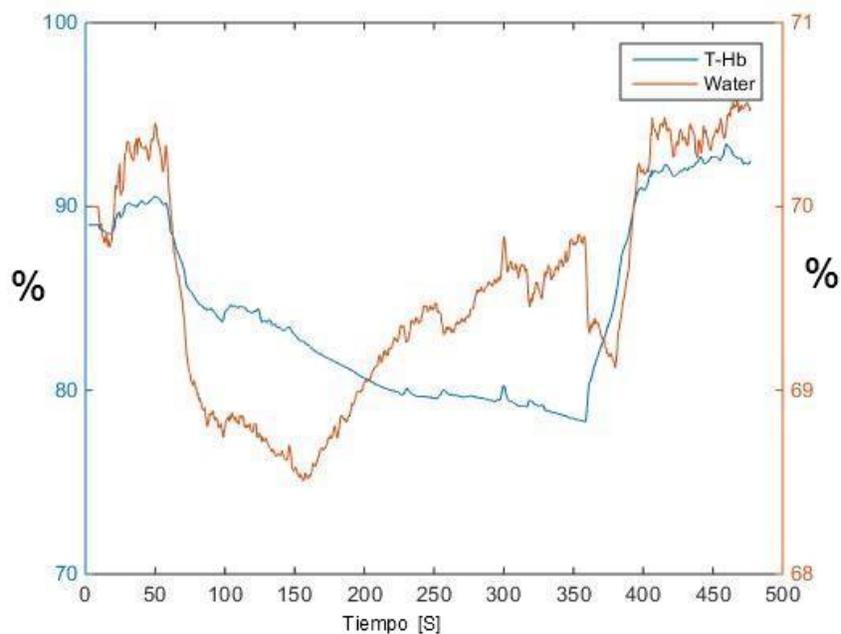


Figura 29 Trazos en el tiempo del comportamiento de la hemoglobina total (tHb) y Agua (H₂O) (Fuente datos: laboratorio Profesor Toronov.)

4.2.7.2 Protocolos y medidas clínicas

Las medidas ilustradas en este apartado fueron realizadas siguiendo el criterio establecido en la propuesta de esta investigación (Ortiz-Trujillo, 2012). Los criterios de inclusión de pacientes y procedimientos de tomas de muestras físicas están descritas en la Tabla 5.

Criterios de Inclusión

Pacientes con edad mínima de 18 años con 24 horas de admisión en UCI y uno de los siguientes diagnósticos: Pacientes que cumplan criterios de sepsis y a pesar de haber suministrado buen aporte de oxígeno tisular de acuerdo al protocolo de Rivers y que a pesar de ello hayan evolucionado a sepsis severa y/o disfunción orgánica múltiple.

Sepsis:

- *Pulso > 90 min*
- *Frecuencia respiratoria > 32/min*
- *Presión arterial sistólica < 90 mmHg*
- *Leucocitos > de 12,000 μL^{-1} o < 4,000 μL^{-1}*

Sepsis severa: Los anteriores más uno de los siguientes:

- *Hipoxemia Arterial ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$)*
- *Gasto urinario < 1 cc/kg/h*
- *Recuento plaquetario < 100,000 células/ μL*

Shock

- *Sepsis más presión arterial sistólica < 90 mmHg luego de haber colocado más de cc de LEV.*
- *Criterios de disfunción orgánica múltiple*
- *Saturación venosa de $\text{O}_2 < 70$ mmHg.*
- *Gasto Urinario < 0.5 cc/kg/h*
- *Aumento de la creatinina > 0.5 mg/kg a partir de la basal.*
- *Anormalidades de la coagulación (INR > 1.5)*
- *Tiempo de tromboplastina parcial activada - TPT > 60 segundos.*
- *Peristaltismo negativo.*
- *Aumento de la Bilirrubina a más de 4mg/dl.*
- *Lactato > 3mmol.*
- *Piel marmórea.*

Criterios de exclusión

- *Familias de pacientes que no desean participar en el estudio*
- *Personas menores de 18 años*

Tabla 5 Procedimiento de inclusión de pacientes en el estudio de oxigenación de tejidos en paciente crítico mediante NIRS. (adaptado de (Ortiz-Trujillo, 2012).

Variables

Se incluyen las siguientes variables demográficas: edad y sexo; tipo de sepsis, presión arterial media (sistólica y diastólica) niveles de glutatión, citocromo medido químicamente y niveles de Oxi – Desoxi Hemoglobina y Citocromo C medido ópticamente.

Técnicas y procedimientos

A las 24 horas del ingreso a la UCI se identificará los criterios de elegibilidad de los pacientes. Quienes cumplan los criterios de inclusión les será solicitado a su acudiente el consentimiento informado para participación en el estudio previa explicación del propósito, riesgos y beneficios. Posteriormente, se procede a la identificación de la información en la historia clínica y se les tomará una muestra de 10 mL de sangre con EDTA la cual será remitida en hielo seco al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Pontificia Bolivariana para su procesamiento, así: 5 mL para evaluación de apoptosis y necrosis por citometría de flujo (yoduro de propidio y DIOC 6), con el suero de los 5 mL restantes se evaluarán caspasas y citocromo C.

Tabla 6 Continuación del procedimiento de inclusión, Variables a recolectar y muestra que deben ser recogidas.

4.2.7.2.1 Procedimiento de medición óptica

Se realizaron tomas de medidas espectrales utilizando un equipo espectroscópico con una fuente de luz. La toma de medidas no genera ningún riesgo para el paciente ya que la potencia lumínica es muy inferior a la necesaria para producir quemaduras en la piel⁴. No existe riesgo de quemaduras u otro riesgo conocido, ya que la luz que se utiliza se encuentra en un rango espectral muy similar al que nos impacta diariamente desde el sol (Slaney, 1997).

Se tomarán datos espectrales mediante dos sondas (fibras ópticas), una que incide luz sobre el área a estudiar y otra que recoge la luz que retorna. Se tomaran estas medidas a nivel del antebrazo, y simultáneamente se aplicará un torniquete, por un breve período (Ver protocolo en la tabla 4).

4.2.7.2.2 Protocolo de toma de medidas en pacientes sépticos

Toma de Medidas - Con aplicación de Torniquete.

- a) Ubicar soporte de sondas en el área de medida, cara anterior del antebrazo, tercio medio. Verificar contacto de las sondas con la piel. Ajustar las correas del soporte de sondas.
- b) Sonda de iluminación, un extremo a la fuente, otro extremo insertar en soporte para aplicación al paciente.
- c) Sonda de lectura, conectar un extremo en ranura de entrada del espectroscopio y el otro al soporte de aplicación al paciente. Ajustar la distancia de conexión entre las dos sondas en el rango permitido (1 - 2 cm) y anotarla para usar en interpretación de datos.

⁴ La sensación de dolor en la piel se produce a temperaturas superiores a aprox. 45°C, temperatura muy inferior a las necesarias para producir quemadura, así que las quemaduras son prevenidas por movimientos reflejos (ICNIRP, 1996).

- d) Ubicar brazalete del tensiómetro en el brazo.
- e) Establecer toma de tiempos según protocolo de toma de medidas escogido.
- f) Toma de datos en oclusión venosa

Presión Oclusión (mm Hg.)	40
Tiempo base (min)	1
Tiempo oclusión (min)	3
Tiempo recuperación (min)	1

Tabla 7 Parámetros de toma de datos con oclusión venosa.

- g) Toma de datos en oclusión arterial

Presión Oclusión (mm Hg.)	Presión sistólica + 40
Tiempo base (min)	1
Tiempo oclusión (min)	3
Tiempo recuperación (min)	1

Tabla 8 Parámetros de toma de datos con oclusión arterial

- h) Toma y almacenamiento de datos espectrales en el computador, para ser analizados posteriormente (*offline*).

4.2.7.2.3 Listado de equipo necesarios

Por parte el proyecto de investigación:

- Computador: con software Spectra Suite.
- Espectrómetro: Ocean Optics QE65 Pro.
- Fuente de Luz: HL-2000-HP-FHSA.
- Sondas de fibra óptica (2).
- Sistema de soporte de fibras en antebrazo.
- Cronómetro
- Esfigmomanómetro (tensiómetro).

Solicitado en la UCI:

- Mesa que permita ubicar los equipos anteriores con rodachinas, para desplazamiento rápido entre pacientes.
- Personal de enfermería para realizar el torniquete.
- El paciente debe permanecer lo más quieto posible para evitar artefactos en los datos.

4.3 Análisis de resultados

Una vez se hayan tomado las medidas de los pacientes, los archivos de datos son consignados en una carpeta de fácil acceso a través de un servicio de nube de datos (Dropbox) para ser analizados localmente y por los investigadores en Canadá. En esta carpeta además se consignan las condiciones de toma de datos y el número de historia clínica para otros análisis del grupo de investigación.

El objetivo del análisis comparativo es compartir los resultados del algoritmo Toronov. De esta forma se agrega el conocimiento y la experticia del grupo de investigación de la Universidad de Ryerson a este trabajo de tesis.

5 Resultados

Este estudio contó con el aval del Comité de Ética de Investigación en Salud de la Universidad Pontificia Bolivariana, fechado en Junio 18 de 2013. Pacientes (o sus acudientes) y voluntarios en este estudio leyeron y firmaron el Consentimiento Informado que describe las condiciones de las tomas de datos y muestras (Ver Apéndice D)

5.1 Medidas en voluntarios

Se realizaron mediciones en voluntarios sanos para establecer el procedimiento de toma de medidas que ayudaría en la toma de medidas en un ambiente clínico posteriormente.

Esto permitió tomar medidas con oclusión arterial y venosa comparables fisiológicamente. En la Figura 30 se aprecia la medida del citocromo CCO, que contrasta con el comportamiento de la HbO_2 . El registro de CCO muestra un leve incremento en relación con los cambios presentados en la variante oxigenada de la hemoglobina. Esto corresponde a lo esperado en el comportamiento de ambas variables y resalta el hecho de la dificultad de cuantificación de cambios en el CCO.

En la Figura 31 se aprecian los resultados de ambas pruebas; resalta el comportamiento de la variante desoxigenada HHb, que crece casi simultáneamente con el comportamiento que presenta la variante oxigenada. Esto se debe a que durante la oclusión venosa la sangre arterial continua entrando al brazo mientras la sangre venosa no tiene oportunidad de regresar. Esto produce un represamiento de sangre y ambas variantes aumentan su concentración en el volumen estudiado (Casavola, Paunescu, Fantini, & Gratton, 2000).

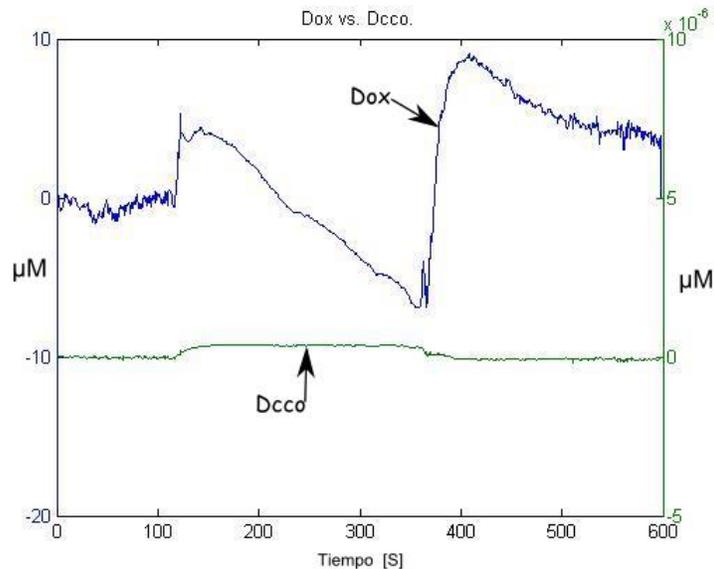


Figura 30 Trazo de HbO_2 y CCO, en tomas de medidas en voluntario sano

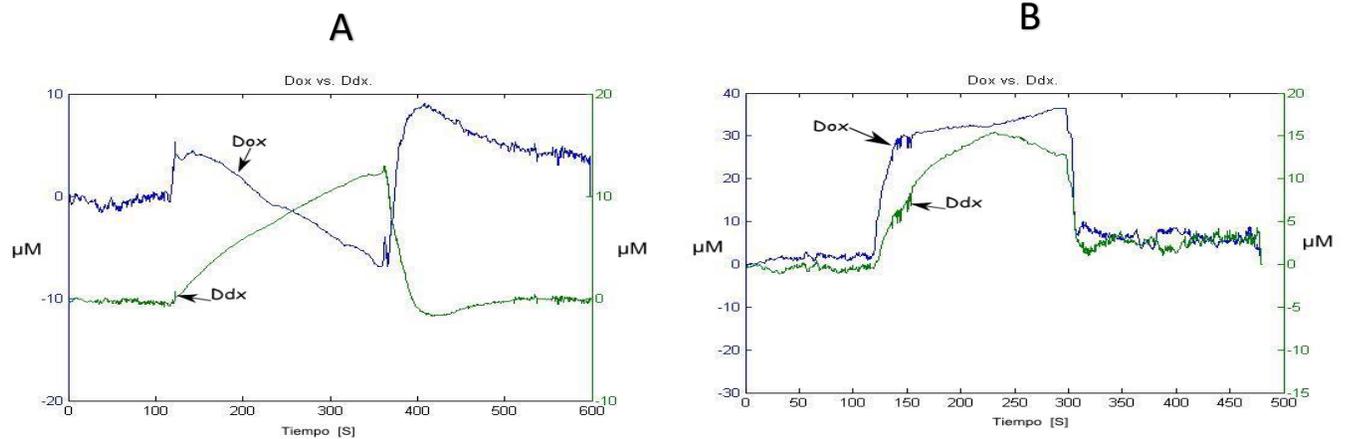


Figura 31 Trazos de HbO_2 (Dox) y HHb (Ddx) en oclusión arterial (A) y venosa (B)

Con esto se satisface el objetivo propuesto inicialmente en este proyecto, *Establecer medidas de cromóforos in-vivo, mediante un equipo NIR en un ambiente experimental.*

5.2 Resultados de mediciones clínicas

Se hicieron mediciones sobre trece pacientes a la fecha de redacción de esta información.

Con estas medidas se cumple el objetivo: *Establecer medidas de cromóforos in-vivo, mediante un equipo NIR en un ambiente clínico.* Las medidas tomadas fueron analizadas con el algoritmo desarrollado en colaboración con el laboratorio del Dr. Toronov. Análisis preliminares fueron hechos por el autor de la tesis para corroborar resultados con el equipo de investigadores Canadiense.

5.2.1 Resultados HbO_2 y HHb

En la Figura 32 se observa el comportamiento de las variables de HbO_2 y HHb durante la toma de medidas en paciente con sepsis. El comportamiento de la variable no oxigenada de la hemoglobina (HHb) muestra el ascenso característico, mientras que la variante oxigenada HbO_2 no tiene un comportamiento de descenso característico, teniendo una ligera tendencia a incrementarse.

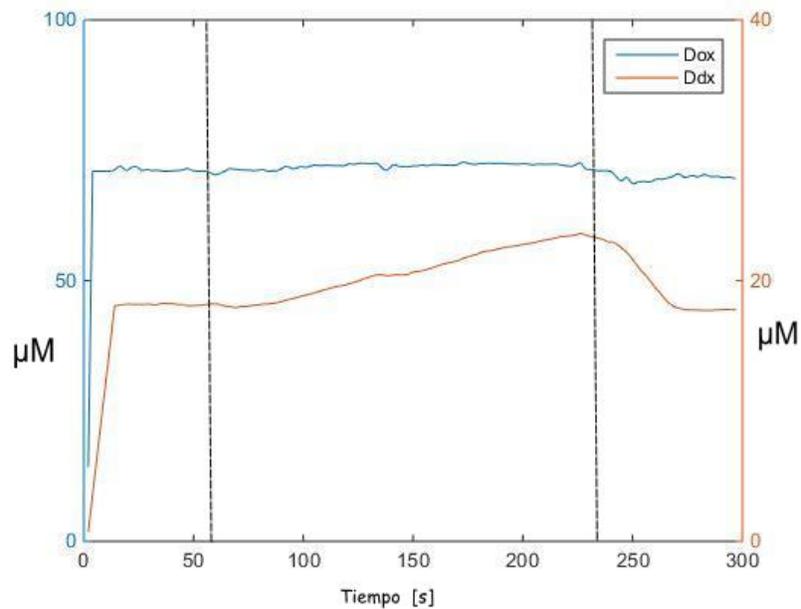


Figura 32: HbO_2 (Dox en la gráfica) y Hb (Ddx) trazo para paciente séptico admitido en el estudio. Las líneas verticales punteadas muestran los tiempos aproximados del comienzo y fin de la oclusión.

5.2.2 Resultados HbO_2 y CCO

En la Figura 33 se observa el comportamiento del Citocromo. El CCO muestra un incremento casi simultáneo con la variante de hemoglobina HbO_2 . Esto podría sugerir acoplamiento de las dos variables. No hay certeza aún del comportamiento de estas variables en pacientes críticos (Epstein & Haghenbeck, 2014).

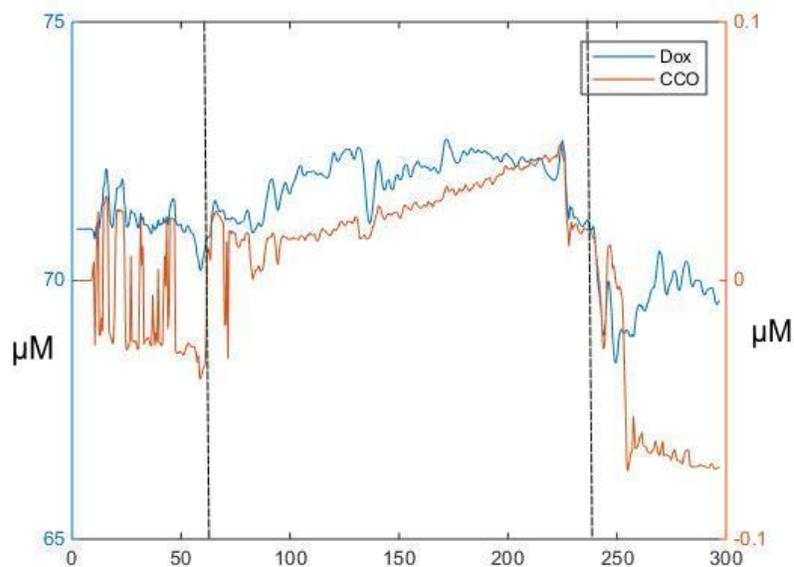


Figura 33 Trazo de HbO_2 y CCO en toma de medidas de paciente séptico.

5.2.3 SO₂ – CCO

La saturación total SO₂ muestra un comportamiento descendente, ver Figura 34, correspondiente al esperado de la variable (Mayeur, Campard, Richard, & Teboul, 2011b), donde se visualiza la hiperemia reactiva al final de la prueba de oclusión. Se destaca el comportamiento del CCO visto anteriormente.

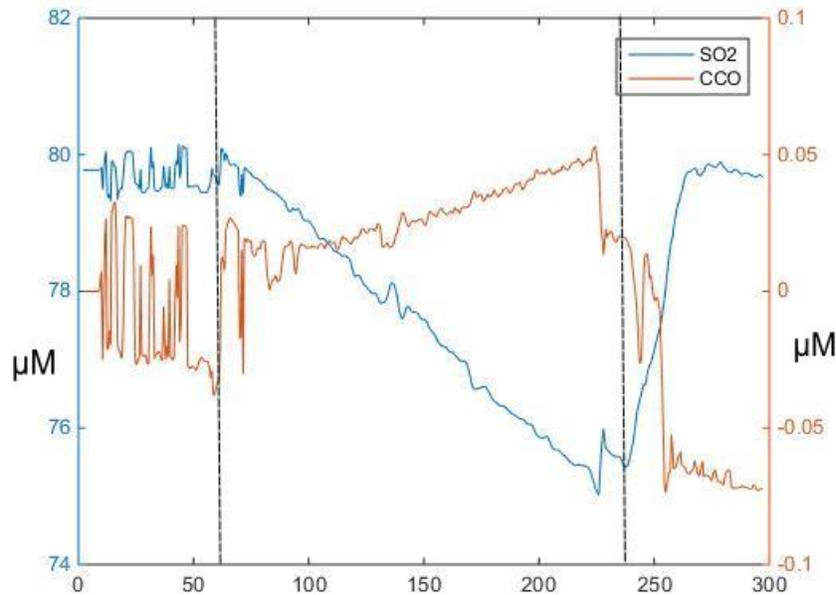


Figura 34 Trazo de SO₂ y CCO

5.3 Análisis comparativo con trabajo de la Universidad de Ryerson.

Para cumplir con el objetivo propuesto consistente en: *Evaluar comparativamente los resultados obtenidos con trabajos similares hechos por otros grupos de investigación*. Se analizan en conjunto con el equipo del laboratorio *Magnetic Resonance Imaging and near infrared spectroscopy* parte del departamento de física en medicina de la Universidad de Ryerson (Toronto, Canadá) los datos tomados en pacientes en la Clínica Universitaria Bolivariana. Este grupo analizó comparativamente los 13 pacientes de los que hasta el momento de escribir este documento se habían recolectado. Aunque la experticia del laboratorio es principalmente en medidas cerebrales, en colaboración con el equipo de la Universidad Pontificia Bolivariana se hicieron adaptaciones al código del algoritmo y a sus equipos. Se realizaron tomas de medidas en antebrazos de voluntarios sanos comparables con las tomadas en pacientes sépticos. Los resultados están consignados en la tesis “Hyperspectral near-infrared spectroscopy for the assessment of septic patients” del investigador de su equipo, Nga Nguyen (Nguyen, 2016)⁵. Se encontró que los cambios de

⁵ El equipo de investigadores del laboratorio del Dr. Toronov hizo un análisis independiente de los datos, correlacionando los resultados de las medidas en pacientes sépticos tomados en CUB con sus propias medidas en voluntarios. Su análisis se enfocó en establecer la correlación entre diversos parámetros dentro de las

concentración entre pacientes y sujetos sanos muestran diferencias estadísticamente significativas; esto implica que las ratas de cambio de las concentraciones de cromóforos pueden ser usadas como factor diferenciador entre pacientes sépticos y los que no lo están (Fink, 2002).

Se encontró que algunos de los datos tomados con los protocolos de Oclusión Arterial (OA) presentaron un comportamiento de Oclusión Venosa (OV) (Ver 5.1) Para hacer esta clasificación, el equipo del Dr. Toronov utiliza el trazo de HbO_2 + HHb para verificar el comportamiento de la hemoglobina total (THb). En la Figura 35 B se muestran trazos de medidas tomadas con un protocolo de oclusión arterial, que al tener un comportamiento incremental se clasifican como realmente venosas. Se pueden contrastar estas medidas con las tomadas bajo el protocolo venoso (Ver Figura 35 C), destacándose en ellas el mismo comportamiento incremental.

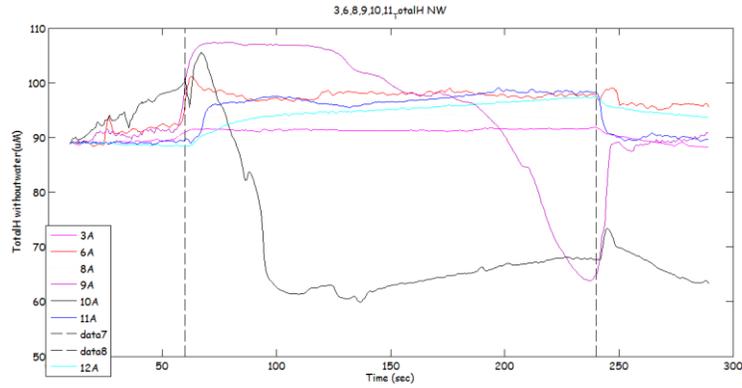
Sin embargo, el que medidas tomadas bajo OA tuvieran un comportamiento incremental para HbO_2 es inusual (Ver Figura 36). Esto puede deberse a múltiples factores que aún no están claros. En el caso de las medidas de HHb (Ver Figura 37 **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) el comportamiento de las OA es inusual, presentando en algunos casos una ligera tendencia al descenso. En las OV y aquellas que se comportaron como venosas el resultado es consistente, manteniéndose un incremento de las concentraciones.

Para las medidas de CCO (Ver Figura 38) el comportamiento estuvo más agrupado en forma de tendencia a decrecer en concentración.

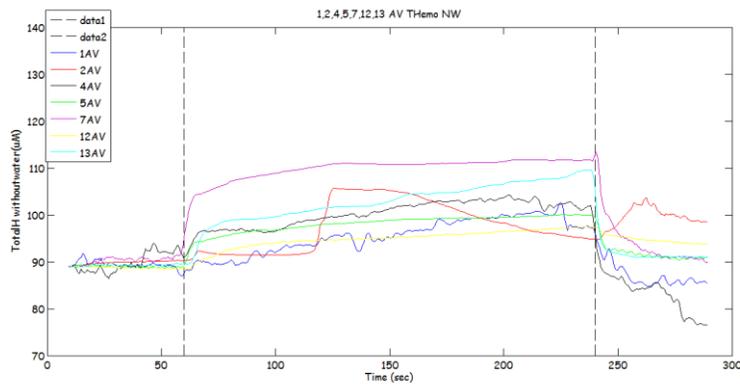
En la Figura 39 se destaca los trazos de SO_2 obtenidos en los pacientes, tanto para oclusión arterial como venosa. Siendo un parámetro derivado de la combinación de los trazos de HbO_2 y HHb, el comportamiento es descendente en la mayoría de las medidas registradas.

medidas para saber si son o no parámetros independientes. Este grupo compartió sus consideraciones con esta investigación de esta manera. La tesis de Nga Nguyen fue hecha de manera independiente a esta tesis.

A



B



C

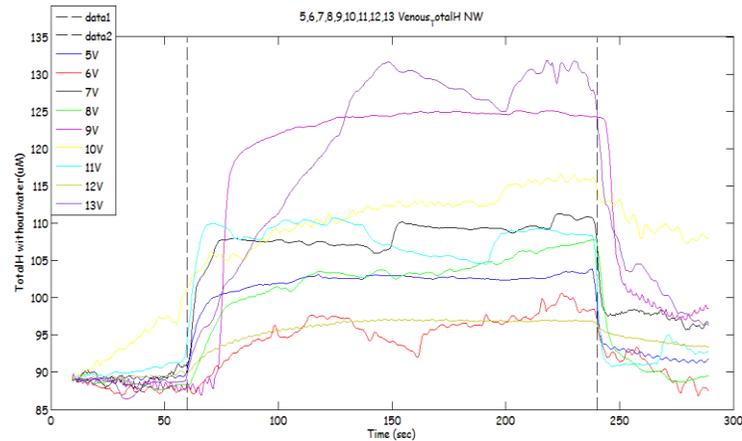


Figura 35 Trazos de Hemoglobina total $THb = HbO_2 + HHb$. Estos trazos dan una idea del comportamiento de la Hemoglobina total en cada una de las tomas de medidas. En A, se puede ver el comportamiento del trazo para tomas de medidas con oclusión arterial. B, medidas en oclusión arterial que muestran un trazo incremental, lo que les da la clasificación de realmente venosas (Actually Venous). En C medidas en oclusión venosa. **NOTA:** Cada uno de los trazos esta marcado con un número de 1 – 13, que corresponde con la numeración de los pacientes originalmente reportados por esta tesis. Así, 11V, corresponde con el paciente 11 de los analizados en la base de datos ligada a su historia clínica.

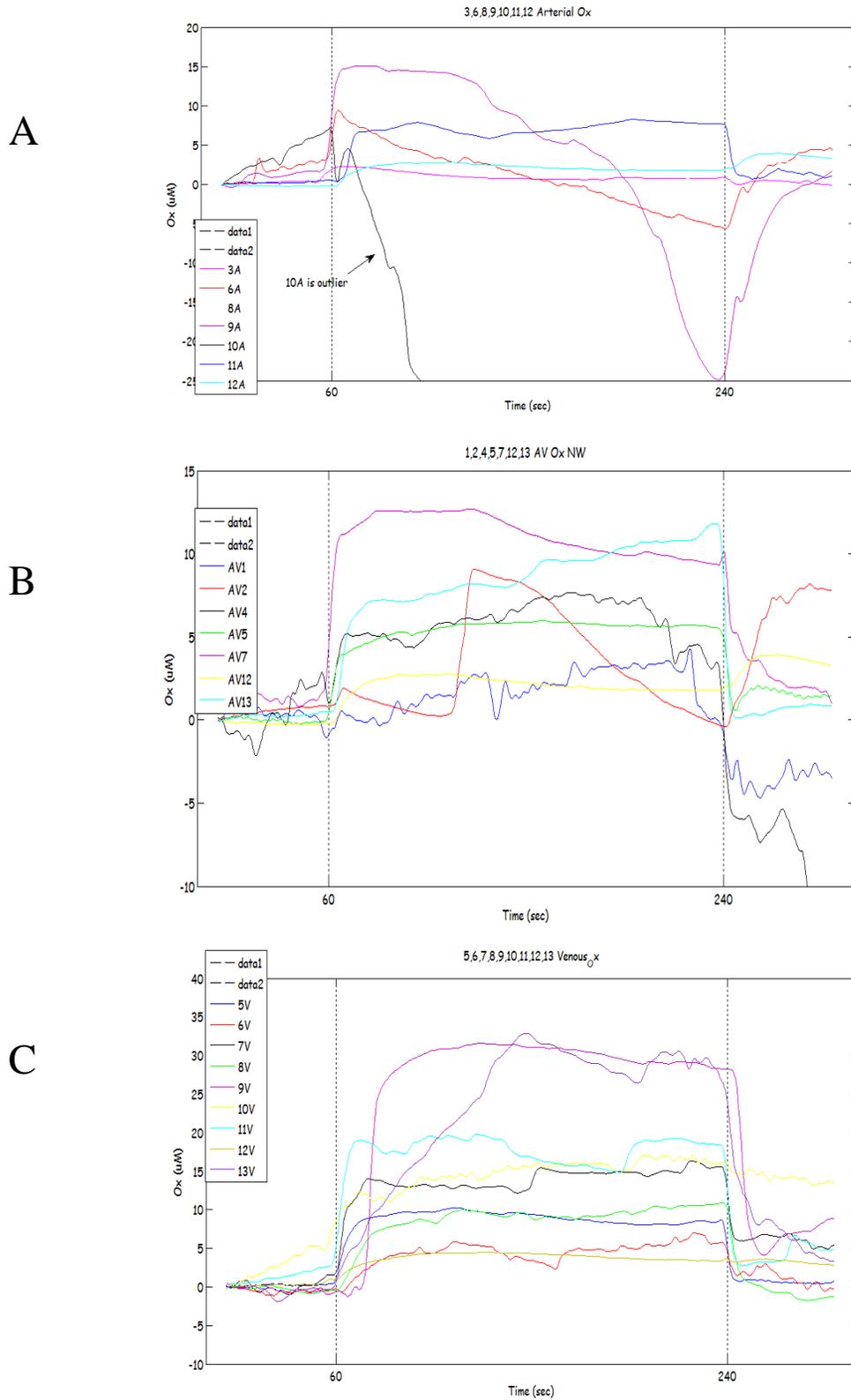


Figura 36 Trazos de comportamiento HbO_2 , para A: Oclusión arterial (OA), B: OA con comportamiento Oclusión Venosa (OV) C: OV

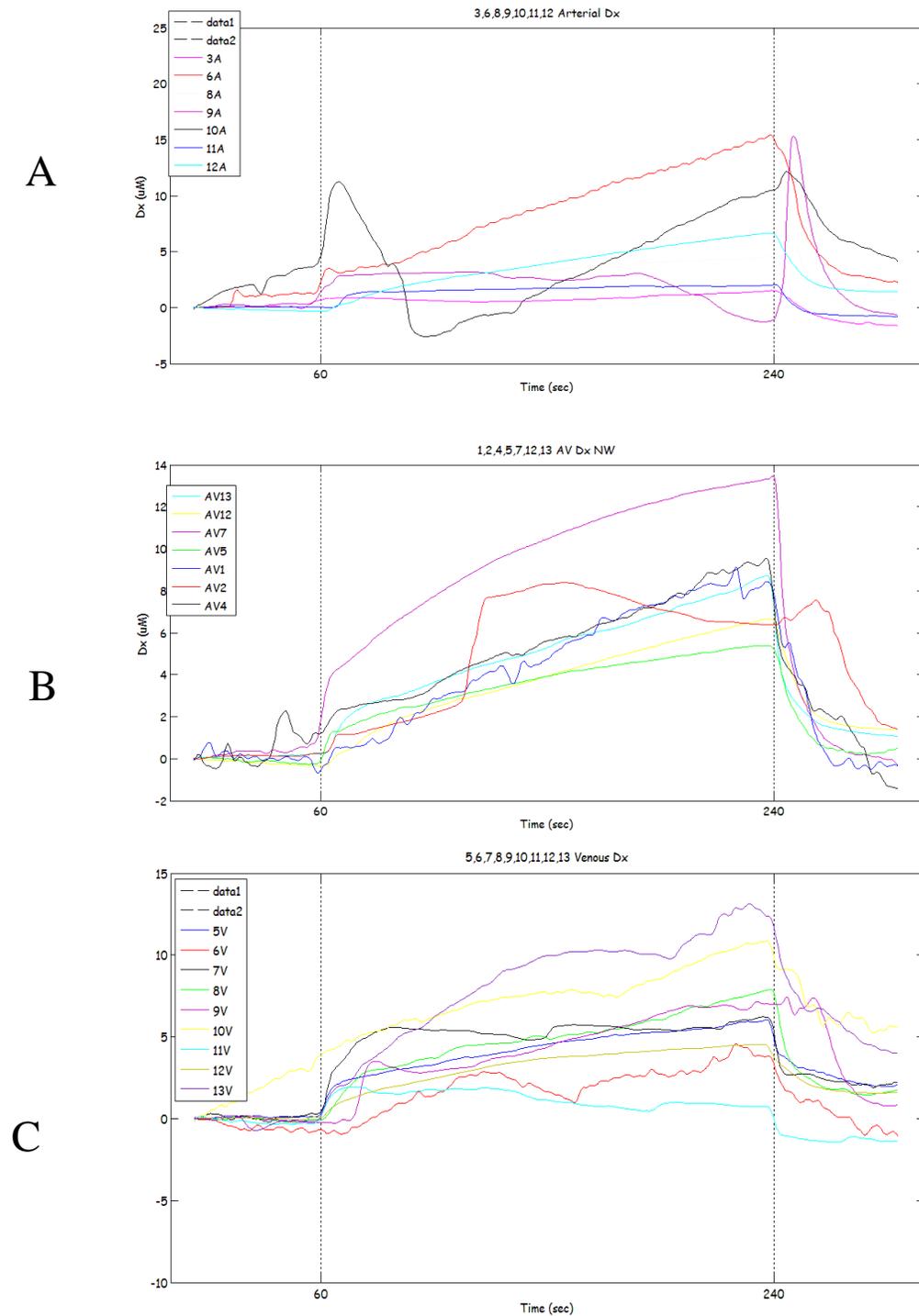
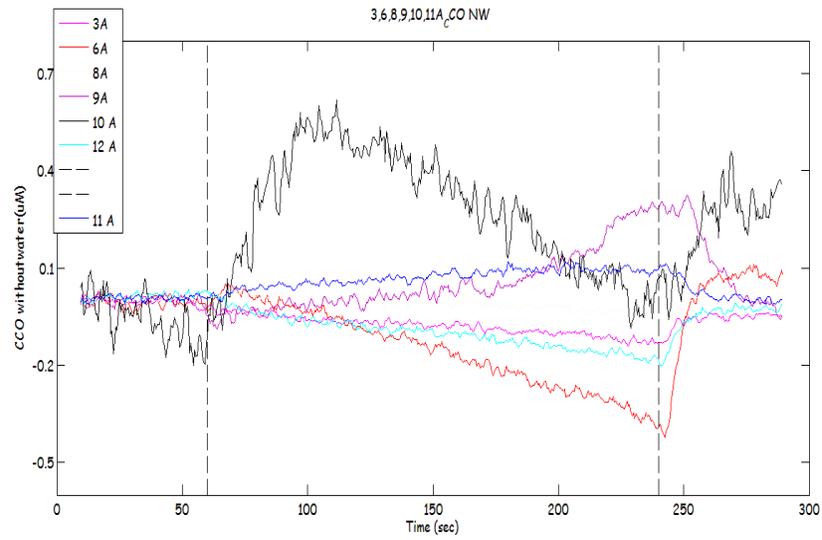
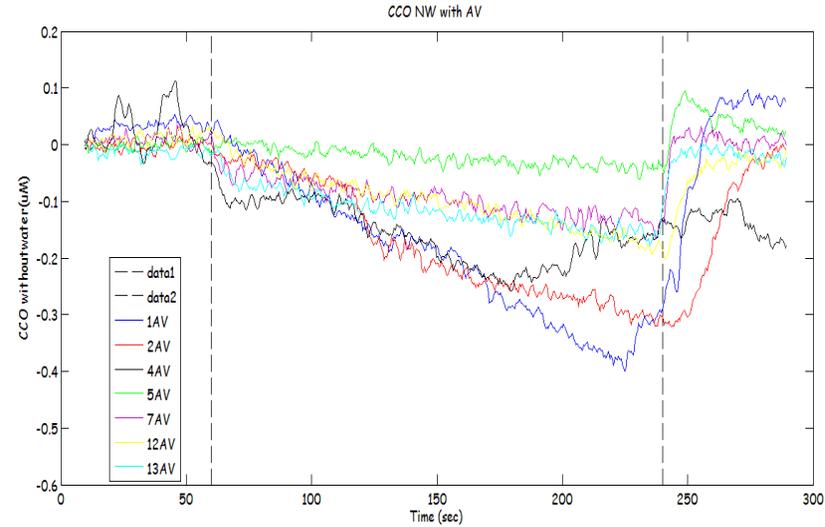


Figura 37 Trazos de comportamiento de HHb, para A: OA, B: OA con comportamiento OV C: OV

A



B



C

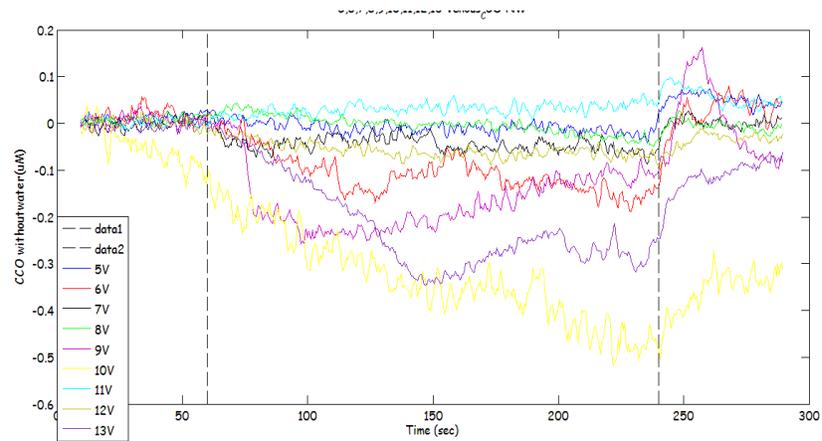


Figura 38 Trazos de comportamiento de CCO para A: OA, B: OA con comportamiento OV, C: OV

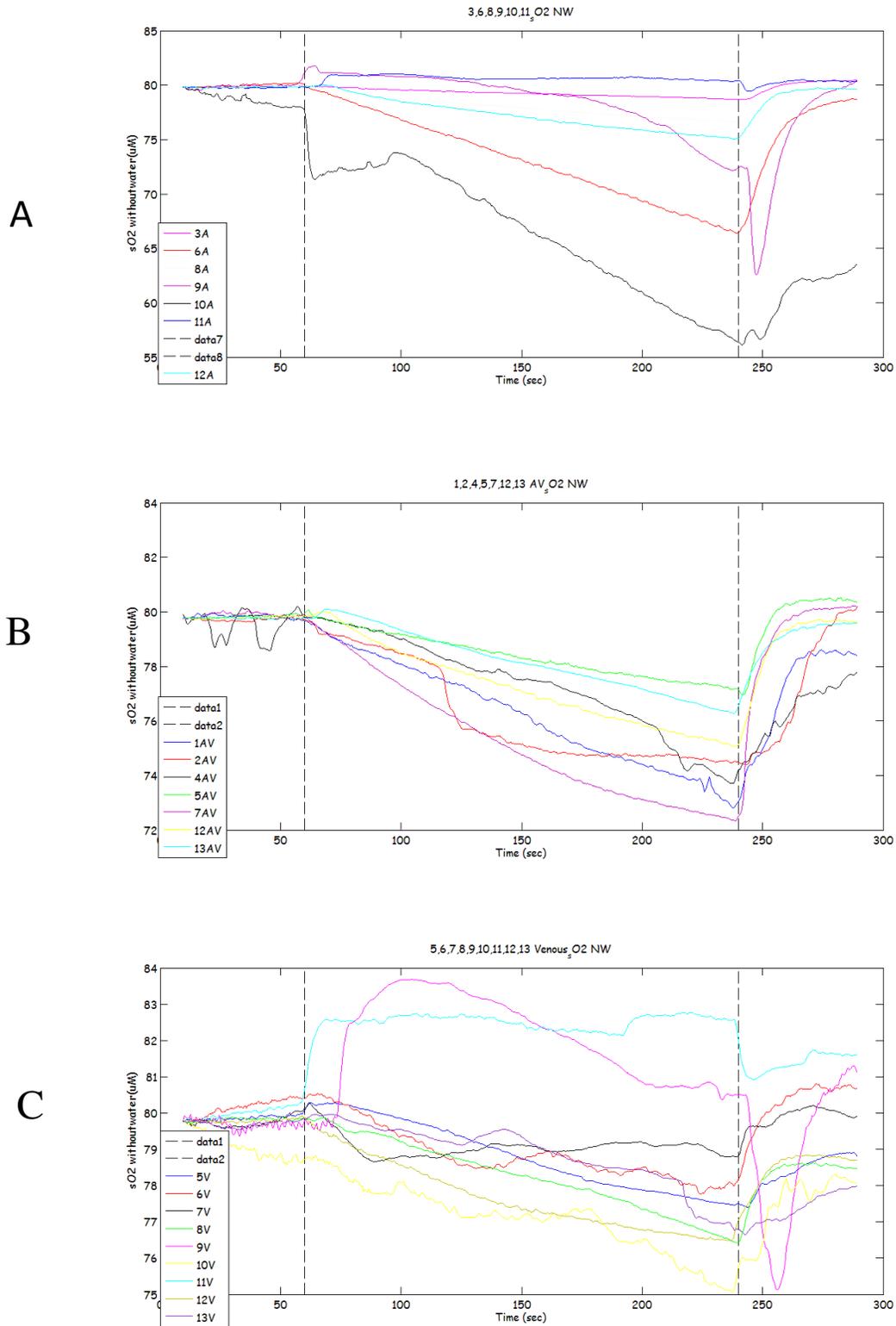


Figura 39 Trazos de comportamiento de SO₂ para A: OA, B: OA con comportamiento OV, C: OV

6 Discusión

En este estudio sobre NIRS para aplicaciones en seguimiento a oxigenación de tejidos, fue hecho con el objetivo de aplicarlo en un ambiente clínico, para investigar su posible aplicación al diagnóstico y pronóstico de la sepsis. Luego de investigar los principios que gobiernan la detección de especies moleculares en tejidos mediante espectroscopia NIR, se procedió a integrar un sistema espectroscópico para el propósito mencionado. Mientras que la detección, medición y seguimiento a parámetros de oxigenación de tejidos basado en medición de hemoglobina es una situación rutinaria hecha por equipos comerciales, no sucede lo mismo con detección de enzimas responsables de la respiración celular. Al momento todavía no se logra el uso rutinario como herramienta clínica a pesar del marcado interés de la ciencia médica por disponer de dicha herramienta para evaluar el metabolismo a nivel mitocondrial.

Se contactaron investigadores internacionales, expertos y casas comerciales productoras de equipos NIRS. Todos corroboraron que tanto algoritmos como instrumentación para los propósitos de mediciones metabólicas mitocondriales permanecen en el campo experimental. Se adelantó una colaboración con el Laboratorio Magnetic Resonance Imaging and near infrared spectroscopy en cabeza del Dr. Vladislav Toronov, con quién se adaptó un algoritmo específico de cuantificación de especies moleculares en la evaluación de sepsis, basado en un trabajo previo de este mismo grupo. Este algoritmo ha sido probado previamente en modelos animales (Nosrati et al., 2015). Durante este estudio se probó en un ambiente clínico, en las instalaciones de la unidad de cuidado intensivo de la Clínica Universitaria Bolivariana. El Dr. Toronov es uno de los pocos científicos que actualmente lidera grupos de estudio para el desarrollo de medidas de cuantificación de cromóforos en tejidos in vivo, cuenta con desarrollos muy interesantes en este campo (Diop et al., 2014; Nosrati et al., 2015; Toronov, 2015).

Las medidas hechas en voluntarios y pacientes confirman la viabilidad del seguimiento de la oxigenación de tejidos, mediante técnicas ópticas como la espectroscopia, no invasivas.

6.1 Comparación de pendientes de oclusión y recuperación

Algunos estudios han reportado los resultados de pendientes de oclusión y recuperación para el parámetro calculado de saturación SO_2 , en paciente crítico (Mayeur et al., 2011b; Skarda, Mulier, Myers, Taylor, & Beilman, 2007). Usando un equipo comercial Inspectra ("Inspectra™ StO2 Tissue Oxygenation Monitor," 2010), Mayeur y otros obtuvieron medidas en pacientes sépticos y sanos y compararon las pendientes de oclusión y recuperación. Las pendientes de oclusión – indicador de desaturación – y de recuperación – reperusión – fueron medidas para ambos grupos. Encontraron diferencias significativas en las pendientes de recuperación entre voluntarios sanos y pacientes sépticos, encontrando resultados más concluyentes cuando se hace oclusión buscando un límite de saturación – 40% en este caso – que cuando se hace mediante un tiempo fijo – 3 min. Las pendientes de saturación estuvieron en tres órdenes de magnitud superiores a las obtenidas en este estudio, lo que subraya el hecho de que no existe una estandarización en el campo de medidas NIRS.

		Valor Promedio	(+/-)	Ajuste (R ²)	(+/-)
HbO₂ (μ M/min)	mO	-1,15	3,77	0,52	0,36
	mR	2,14	9,88	0,43	0,31
CCO (μ M/min)	mO	-0,05	0,07	0,79	0,22
	mR	0,11	0,28	0,50	0,30
SO₂ (%/min)	mO	-2,12	1,68	0,89	0,24
	mR	6,70	5,32	0,74	0,14

Tabla 9 Pendientes de Oclusión y Recuperación promedio obtenidos de los 13 pacientes analizados, para tomas en oclusión arterial. Se presentan las pendientes de ajuste a un modelo lineal, en el tramo de oclusión (mO) y de recuperación (mR). Las pendientes o rata de cambio de las unidades que representan concentración expresadas en sus unidades μ M/min y en el caso de saturación %/min. El ajuste es expresado como el cuadrado de los residuales calculados.

Para caracterizar los trazos de cada uno de los parámetros analizados se procedió a establecer un ajuste lineal para obtener las pendientes de los tramos completos descendientes y ascendentes. Las pendientes analizadas corresponden a los tramos entre el momento de la oclusión y liberación del torniquete (tramo oclusión) y entre la liberación del torniquete y el final de las medidas (tramo recuperación). Estos valores se especifican en la Tabla 9.

Para el caso de las pendientes de los trazos de HbO₂ se nota una gran variabilidad (oclusión 3.77 y recuperación 9.88) y un bajo ajuste (0,52 y 0,43 respectivamente). Concuera con lo expresado acerca de lo inusual de estos resultados. Indica además que este parámetro no reporta unas medidas de pendiente confiables en las condiciones que fue tomado en este estudio.

En el caso de la saturación los ajustes fueron más robustos (0,89 en oclusión y 0,74 en recuperación) y las pendientes cercanas a los valores reportados en otros estudios. Este parámetro es el indicado por la mayoría de equipos comerciales, de esta manera puede servir de puente de comparación con otros estudios.

Una comparación directa se puede hacer con los datos reportados para estudios en pacientes sépticos midiendo sépticos midiendo saturación (SO₂) mediante NIRS que se muestran en la

Tabla 10. Mientras en este estudio el valor promedio en tramo de recuperación fue de 6,70 %/min, Mayeur y otros reportaron pendientes un orden de magnitud superior, 66 %/min (Mayeur, Campard, Richard, & Teboul, 2011a) y dos órdenes superior reportaron Skarda y otros en 198 %/min (Skarda et al., 2007) y con niveles de variabilidad significativos para todos ellos. En el tramo de oclusión la pendiente reportada es de -2,12 %/min mientras el valor reportado por Mayeur y otros fue ligeramente superior -9.1 %/min.

	En este estudio	(+/-)	Mayeur y otros	(+/-)	Skarda y otros	(+/-)
Pendiente de Oclusión SO ₂ (%/Min)	-2,12	1,68	-9,1	2,80	N.R.	N.R.
Pendiente de Recuperación SO ₂ (%/Min)	6,70	5,32	66,00	84	198	42

Tabla 10 Pendientes (rata de cambio) de trazos de SaO₂ obtenidos en pacientes sépticos. Para este estudio se incluyeron 13 pacientes. Los datos presentados para las pendientes en el tramo de oclusión y de recuperación en oclusión arterial hecha en antebrazo. Los datos fueron obtenidos para este estudio en antebrazo (cara palmar, tercio medio) y los estudios comparados fueron tomados en mano (eminencia tenar).

Estas diferencias pueden explicarse en factores como son el sitio anatómico donde se tomaron las medidas (antebrazo vs. mano) la separación entre sonda emisora y receptora (10 mm. vs. 15 mm.) y por último el algoritmo usado para establecer los valores de los parámetros. Otros factores como el compromiso de la sepsis, adiposidad y el nivel de edema pueden influir en alguna medida también.

6.2 Viabilidad del seguimiento al metabolismo mitocondrial

El seguimiento al parámetro CCO, se presume como un indicador del metabolismo mitocondrial y en general, tisular. En este estudio se estableció las pendientes promedio en los tramos de oclusión y recuperación, para los 13 pacientes analizados. Los valores de las pendientes fueron bajos (O: -0.05 y R: 0,11), comparados con los encontrados para HbO₂ (O: -1.15, R: 2.14) y SO₂ (O :-2.12, R 6.7). Esto es consistente con lo expresado por otros autores en el sentido de que este parámetro debe tener un comportamiento de cambio con cierta latencia con respecto a los cambios de la hemoglobina (Cooper & Springett, 1997). En este caso es importante subrayar que dada la dificultad de confirmar el estado redox del citocromo mediante medidas alternativas, debe por lo menos garantizarse que no exista un acople entre medidas de concentración de las variantes de la hemoglobina y las del estado redox del citocromo y establecer su independencia como parámetros. Es también importante hacer un análisis de la correlación entre un grupo amplio de voluntarios sanos y un número más amplio de pacientes. Esto con el fin de buscar evidencia estadística que demuestre un comportamiento diferente de los parámetros recolectados en presencia de una prueba de oclusión, lo que se puede aprovechar clínicamente.

Será además oportuno comparar las pendientes del trazo del CCO con otros parámetros clínicos usualmente medidos en pacientes críticos y con el desenlace en pacientes.

Aunque en general las medidas estuvieron de acuerdo a los resultados de otros estudios se obtuvieron resultados que todavía necesitan interpretación fisiológica o física. En particular las variaciones en la cuantificación de la hemoglobina en sus variantes, en presencia del edema de los tejidos.

Desde la perspectiva de la fisiología, el paciente séptico presenta un balance homeostático alterado. Una hipótesis que explique el comportamiento medido puede ser el aumento de la disponibilidad del oxígeno en tejidos cuando el balance de fluidos se inclina hacia la sobrecarga; al aumentar el

balance local de fluidos, la distancia de entrega del oxígeno aumenta y su difusión no es efectiva (Balestra et al., 2009). Esto puede coincidir con el aumento observado en la HbO₂.

Desde el punto de vista físico y de detección, un aumento de fluidos localizado (+H₂O) resulta en un aumento de la absorción de las longitudes de onda del infrarrojo, que de alguna manera puede afectar la cuantificación de las especies moleculares por parte del algoritmo de detección. Al modificarse las concentraciones de cromóforos base, en particular el agua, se puede presentar el efecto observado en los numerales 5.2 y 5.3. Esto requerirá de mayor investigación y posiblemente refinación de los métodos usados por el algoritmo para cuantificar cromóforos.

6.3 Limitaciones

La toma de medidas con un sistema experimental como el que se usó en este estudio puede tener algunas dificultades. La aplicación del torniquete en el tiempo determinado debe coordinarse con la toma de medidas. Esto puede influir en el análisis posterior de las medidas, ya que no hay certeza de los tiempos de inicio y final de la oclusión. Adicionalmente el torniquete debe aplicarse con la mayor rapidez una vez se inicia la oclusión para evitar el efecto de entrada de más sangre arterial al compartimiento analizado (arterias y tejidos del brazo), lo cual no siempre es posible con los equipos manuales utilizados. El torniquete empleado consistió de un esfigmomanómetro neumático, que puede ser susceptible de cambios en la presión regulada debido a fugas.

La fuente de potencia utilizada no tenía una potencia suficiente, lo que hubiera permitido obtener medidas más centrales en rango de detección del instrumento (Ver Figura 20 y sección 4.1.4). Esto impidió tomar medidas con separación entre sondas de entrada y lectura mayor que permitiera abarcar un mayor volumen de tejido. De esta forma se habría podido verificar el comportamiento de los cromóforos y corroborar si existe alguna diferencia en presencia de edema que requiera una mayor profundidad de sondeo.

Los efectos del aumento de la temperatura local de la piel se han publicado con anterioridad y pueden llevar a un considerable cambio en las medidas NIRS. Cambios de temperatura inducidos por compresas calientes en la piel de antebrazo han desviado significativamente los resultados de las medidas de oxigenación obtenidas en la misma localización mediante equipos NIRS (Davis, Fadel, Cui, Thomas, & Crandall, 2006). Sin embargo en la experiencia con la fuente de relativa baja potencia usada en este estudio no se observaron aumentos de temperatura que pudieran ser detectadas por los voluntarios o pacientes. Esto quiere decir que las temperaturas generadas son inferiores al nivel anteriormente mencionado del umbral de dolor (45° C). Adicionalmente, el área de acción de la fuente de luz es de unos pocos mm de diámetro, con lo cual la transferencia de temperatura es mínima. Con el uso de fuentes de luz de potencia más elevada podría ser una consideración importante medir el aumento de temperatura local y el efecto en el cambio de las medidas. En pruebas hechas en el laboratorio de Canadá, se usó una fuente de luz de mayor potencia que en algunos casos genera algún grado de incomodidad sugerente de incremento de temperatura.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden tener algún tipo de desviación por incluir medidas tomadas en antebrazos y no considerar el índice de masa corporal como indicador de tejido adiposo. El profesor Toronov recomendó hacer las medidas en la mano (eminencia tenar) para disminuir en la medida de lo posible efectos del edema y tejido adiposo. Aunque se trabajó en varios prototipos para sostener las sondas en la eminencia tenar, no se lograron resultados satisfactorios y fue necesario continuar con la toma de medidas en antebrazo.

En lo sucesivo y para continuar con las medidas sería interesante utilizar medidas del índice de masa corporal y establecer la relación con las medidas tomadas mediante NIRS.

Se recomienda trabajar con un espectro más amplio que el detectado por el espectroscopio QE65Pro. Esto con el fin de establecer con mayor claridad la señal del agua en el espectro y poder extraerla. Esto no se pudo llevar a cabo durante esta investigación, por limitaciones técnicas del equipo expuestas por la empresa fabricante del equipo (Ocean Optics). Este tipo de detectores tienen limitación hasta 1100 nm.

7 Conclusiones

En el trabajo de revisión del estado del arte, con el sistema, su aplicación experimental y el desarrollo de los protocolos clínicos y técnicos, se pudieron hacer las siguientes observaciones a manera de conclusión:

La herramienta NIRS puede llegar a tener un valor clínico importante que permita hacer un manejo más ágil y seguro del paciente crítico con sepsis. Sin embargo es necesario adelantar trabajo para hacerla confiable desde el punto de vista de la información que provee⁶. Para esto se requiere de un esfuerzo a nivel científico, para identificar y cuantificar las enzimas responsables del metabolismo celular de manera confiable y cierta. Esto todavía demanda una etapa experimental más amplia.

Una vez se cumpla el paso anterior sería necesario diseñar un ensayo clínico amplio con esta herramienta que permita concluir sobre la mejor manera de incluir la información provista de manera confiable en los protocolos de cuidado clínico de paciente crítico con sepsis. Estos ensayos clínicos deben hacer énfasis en comprobar de manera rigurosa las hipótesis planteadas por la ciencia respecto de las variables medidas por los sistemas NIRS, en relación con la sepsis. En particular la relación de las medidas de metabolismo con las diferentes etapas de la sepsis y como puede esta información ser más efectiva en el manejo del paciente séptico (Gerovasili, Dimopoulos, Tzanis, Anastasiou-Nana, & Nanas, 2010).

El campo de la detección NIRS no está estandarizado. Quizás es debido a la naturaleza experimental de la técnica y a que todavía no se desarrolle una aplicación clínica. Lo propio ocurre en la instrumentación comercial. En quipos comerciales no hay una apropiada estandarización, en los rangos de operación de los instrumentos ni en las condiciones de operación para medidas dinámicas o estáticas (Marco Ferrari et al., 2011). No hay consenso científico tampoco en las mediciones de cromóforos, particularmente de los que permiten una medición de la actividad mitocondrial (Mason et al., 2014). Y tampoco existe consenso sobre la utilidad clínica del NIRS (Elwell & Cooper, 2011).

⁶ Medidas absolutas de cromóforos no son por ahora confiables. Tanto en medidas de saturación (Murkin & Arango, 2009) como en medidas de citocromo pueden encontrarse diferencias significativas en concentraciones absolutas. Por lo tanto clínicamente es más importante el contexto de la medida que el valor absoluto.

Desde el punto de vista de la ingeniería es interesante trabajar en aspectos que permitan adecuar al ambiente clínico el sistema.

- Es necesario trabajo multidisciplinario para obtener una herramienta eficaz a partir de los principios de detección de cromóforos. Se requiere validar que las medidas cuantitativas obtenidas correspondan a valores fisiológicos de las especies monitoreadas. Esto es importante en el caso del citocromo. Para ello es necesario más investigación básica.
- Trabajar en disminuir los artefactos de movimiento y el error que introducen en las medidas. Mejorar la robustez de los sistemas de medida, buscando medir repetibilidad y confiabilidad.
- El sistema usado actualmente toma datos en una primera etapa y posteriormente se analizan. Es una necesidad hacer el análisis en tiempo real, para entregar al equipo clínico los resultados diagnósticos a tiempo.
- Integrar un sistema de toma de medidas autónomo con disponibilidad rápida. La fuente que utilizada debe permitírsele que se estabilice 5 minutos antes de cada toma y el aprestamiento del sistema se vuelve lento, pues hay que encender todo desde cero. Es recomendable integrar una unidad de potencia (UPS) que permita el funcionamiento continuo de la fuente y el espectroscopio.
- Integración de la herramienta en el campo clínico. Las unidades de cuidado intensivo se caracterizan por tener una gran cantidad de instrumentación y sensores de diverso tipo. Así que una forma en que esta herramienta se puede integrar más armónicamente con el entorno de la unidad de cuidados intensivos es mediante la miniaturización. Existen equipos espectroscópicos con características similares al usado en este trabajo con un tamaño muy inferior, que pueden ser integrados a los sistemas de monitoreo de las UCI. Así mismo el trabajo que se haga para hacer las sondas de toma de medidas más pequeñas y menos intrusivas será interesante desde el punto de vista del flujo de trabajo en el cuidado del paciente crítico.
- Un desarrollo futuro a considerar con respecto a mediciones NIRS de oxigenación de tejidos es fibras fuente-detector que sean fáciles de adherir, con una aproximación a la superficie tangencial, no perpendiculares como se usan en este proyecto; de esta forma los artefactos del movimiento del paciente (muy difíciles de controlar o prevenir) se minimizarán. De la misma manera se pueden ensayar adhesivos que permitan mejorar la relación señal ruido (Yücel, Selb, Boas, Cash, & Cooper, 2014).

Referencias

- Amara, C. E., Marcinek, D. J., Shankland, E. G., Schenkman, K. a, Arakaki, L. S. L., & Conley, K. E. (2008). Mitochondrial function in vivo: spectroscopy provides window on cellular energetics. *Methods (San Diego, Calif.)*, 46(4), 312–8. <http://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.10.001>
- Aoyagi, T. (2003). Pulse oximetry: Its invention, theory, and future. *Journal of Anesthesia*, 17(4), 259–266. <http://doi.org/10.1007/s00540-003-0192-6>
- Baigorri-González, F., & Lorente Balanza, J. A. (2005). Oxigenación tisular y sepsis. *Medicina Intensiva*, 29(3), 178–184. [http://doi.org/10.1016/S0210-5691\(05\)74225-X](http://doi.org/10.1016/S0210-5691(05)74225-X)
- Bale, G., Mitra, S., Meek, J., Robertson, N., & Tachtsidis, I. (2014). A new broadband near-infrared spectroscopy system for in-vivo measurements of cerebral cytochrome-c-oxidase changes in neonatal brain injury. *Biomedical Optics Express*, 5(10), 3450–66. <http://doi.org/10.1364/BOE.5.003450>
- Balestra, G. M., Legrand, M., & Ince, C. (2009). Microcirculation and mitochondria in sepsis: getting out of breath. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 22(2), 184–90. <http://doi.org/10.1097/ACO.0b013e328328d31a>
- Barker, S., Hay, W., Miyasaka, K., & Poets, C. (2002). Oxymetry - Principles. Retrieved April 15, 2015, from <http://oximetry.org/pulseox/principles.htm>
- Barret, K., Books, H., Boitano, S., & Barman, S. (2010). *Review of Medical Physiology*.
- Bend Radius & Mechanical. (2015). Retrieved December 7, 2015, from <http://oceanoptics.com/product-category/bend-radius-and-mechanical/>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). The Respiratory Chain Consists of Four Complexes: Three Proton Pumps and a Physical Link to the Citric Acid Cycle. In *Biochemistry*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22505/>
- Bezemer, R., Lima, A., Myers, D., Klijn, E., Heger, M., Goedhart, P. T., ... Ince, C. (2009). Assessment of tissue oxygen saturation during a vascular occlusion test using near-infrared spectroscopy: the role of probe spacing and measurement site studied in healthy volunteers, 7, 1–7. <http://doi.org/10.1186/cc8002>
- Blanco, M., & Villarroya, I. (2002). NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), 240–250. [http://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](http://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)
- Boas, D. a, Elwell, C. E., Ferrari, M., & Taga, G. (2014). Twenty years of functional near-infrared spectroscopy: introduction for the special issue. *NeuroImage*, 85 Pt 1, 1–5. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.11.033>

- Carrillo-Esper, R., Núñez-Bacarreza, J. J., & Carrillo-Córdova, J. R. (2007). Saturación venosa central. Conceptos actuales. *Revista Mexicana de Anestesiología*, *30*(3), 165–171.
- Casavola, C., Paunescu, L. A., Fantini, S., & Gratton, E. (2000). Blood flow and oxygen consumption with near-infrared spectroscopy and venous occlusion: spatial maps and the effect of time and pressure of inflation. *J Biomed Opt*, *5*(3), 269–276. <http://doi.org/10.1117/1.429995>
- Chan, E. D., Chan, M. M., & Chan, M. M. (2013). Pulse oximetry: Understanding its basic principles facilitates appreciation of its limitations. *Respiratory Medicine*, *107*(6), 789–799. <http://doi.org/10.1016/j.rmed.2013.02.004>
- Chance, B., & Williams, G. R. (1955). ARTICLE: RESPIRATORY ENZYMES IN DIFFERENCE SPECTRA.
- Chandrasekhar, S. (1960). *Radiative Transfer*. New York Dover.
- Colin, G., Nardi, O., Polito, A., Aboab, J., Maxime, V., Clair, B., ... Annane, D. (2012). Masseter tissue oxygen saturation predicts normal central venous oxygen saturation during early goal-directed therapy and predicts mortality in patients with severe sepsis*. *Critical Care Medicine*, *40*(2), 435–441. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182329645>
- Cooper, C. E., Cope, M., Quaresima, V., Ferrari, M., Nemoto, E., Springett, R., ... Delpy, D. T. (1997). Measurement of cytochrome oxidase redox state by near infrared spectroscopy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Cooper, C. E., & Springett, R. (1997). Measurement of cytochrome oxidase and mitochondrial energetics by near-infrared spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *352*(1354), 669–676. <http://doi.org/10.1098/rstb.1997.0048>
- Cope, M. (1991). *The application of near infrared spectroscopy to non invasive monitoring of cerebral oxygenation in the newborn infant*.
- Cope, M., & Delpy, D. T. (1988). System for long-term measurement of cerebral blood and tissue oxygenation on newborn infants by near infra-red transillumination. *Medical & Biological Engineering & Computing*, *26*, 289–294. <http://doi.org/10.1007/BF02447083>
- Cysewska-Sobusiak, A. (2001). Metrological problems with noninvasive transillumination of living tissues. *Proc. SPIE*. proceeding. <http://doi.org/10.1117/12.432969>
- Davis, S. L., Fadel, P. J., Cui, J., Thomas, G. D., & Crandall, C. G. (2006). Skin blood flow influences near-infrared spectroscopy-derived measurements of tissue

- oxygenation during heat stress. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(1), 221–224. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00867.2005>
- Delpy, D., & Cope, M. (1997). Quantification in tissue near-infrared spectroscopy. ... of the Royal Society of London. ..., 11–20. Retrieved from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/352/1354/649.short>
- Delpy, D. T. (1999). About niro news. *Measurement*, (1).
- Delpy, D. T., Cope, M., van der Zee, P., Arridge, S., Wray, S., & Wyatt, J. (1988). Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement. *Physics in Medicine and Biology*, 33(12), 1433–1442. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/33/12/008>
- Diop, M., Wright, E., Toronov, V., Lee, T.-Y., & St Lawrence, K. (2014). Improved light collection and wavelet de-noising enable quantification of cerebral blood flow and oxygen metabolism by a low-cost, off-the-shelf spectrometer. *Journal of Biomedical Optics*, 19(5), 57007. <http://doi.org/10.1117/1.JBO.19.5.057007>
- Dix, L. M. L., van Bel, F., Baerts, W., & Lemmers, P. M. A. (2013). Comparing near-infrared spectroscopy devices and their sensors for monitoring regional cerebral oxygen saturation in the neonate. *Pediatr Res*, 74(5), 557–563. JOUR. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/pr.2013.133>
- Dolan - Jenner. (2015). Retrieved December 4, 2015, from http://www.dolan-jenner.com/Catalog/PDFs/Glass_Single_Straight.pdf
- Elwell, C. E., & Cooper, C. E. (2011). Making light work: illuminating the future of biomedical optics. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 369(1955), 4358–79. <http://doi.org/10.1098/rsta.2011.0302>
- Epstein, C. D., & Hagenbeck, K. T. (2014). Bedside assessment of tissue oxygen saturation monitoring in critically ill adults: an integrative review of the literature. *Critical Care Research and Practice*, 2014, 709683. <http://doi.org/10.1155/2014/709683>
- Fantini, S., Franceschini, M. A., & Gratton, E. (1994). Semi-infinite-geometry boundary problem for light migration in highly scattering media: a frequency-domain study in the diffusion approximation. *Journal of the Optical Society of America B*, 11(10), 2128. <http://doi.org/10.1364/JOSAB.11.002128>
- Fantini, S., Hueber, D., Franceschini, M. a, Gratton, E., Rosenfeld, W., Stubblefield, P. G., ... Stankovic, M. R. (1999). Non-invasive optical monitoring of the newborn piglet brain using continuous-wave and frequency-domain spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, 44(6), 1543–1563. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/44/6/308>

- Fellahi, J.-L., Butin, G., Zamparini, G., Fischer, M.-O., Gérard, J.-L., & Hanouz, J.-L. (2014). Lower limb peripheral NIRS parameters during a vascular occlusion test: an experimental study in healthy volunteers. *Annales Françaises D'anesthésie et de Réanimation*, 33(1), e9-14. <http://doi.org/10.1016/j.annfar.2013.11.014>
- Ferrari, M., Muthalib, M., & Quaresima, V. (2011). The use of near-infrared spectroscopy in understanding skeletal muscle physiology: recent developments. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 369(1955), 4577–90. <http://doi.org/10.1098/rsta.2011.0230>
- Ferrari, M., & Quaresima, V. (2012). A brief review on the history of human functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) development and fields of application. *Neuroimage*, 63, 921–935. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.03.049>
- Ferrari, M., & Quaresima, V. (2012). Near infrared brain and muscle oximetry : from the discovery to current applications. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14(November 2011), 1–14. <http://doi.org/10.1255/jnirs.973>
- Fink, M. P. (2002). Bench-to-bedside review: Cytopathic hypoxia. *Critical Care (London, England)*, 6(6), 491–9. <http://doi.org/10.1186/cc1824>
- Garcia-Simon, M., Morales, J. M., Modesto-Alapont, V., Gonzalez-Marrachelli, V., Vento-Rehues, R., Jorda-Miñana, A., ... Monleon, D. (2015). Prognosis Biomarkers of Severe Sepsis and Septic Shock by 1H NMR Urine Metabolomics in the Intensive Care Unit. *PloS One*, 10(11), e0140993. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0140993>
- Gerovasili, V., Dimopoulos, S., Tzani, G., Anastasiou-Nana, M., & Nanas, S. (2010). Utilizing the vascular occlusion technique with NIRS technology. *International Journal of Industrial Ergonomics*, 40(2), 218–222. <http://doi.org/10.1016/j.ergon.2009.02.004>
- Gómez, H., Mesquida, J., Simon, P., Kim, H. K., Puyana, J. C., Ince, C., & Pinsky, M. R. (2009). Characterization of tissue oxygen saturation and the vascular occlusion test: influence of measurement sites, probe sizes and deflation thresholds. *Critical Care (London, England)*, 13 Suppl 5, S3. <http://doi.org/10.1186/cc8001>
- Gómez, H., Torres, A., Polanco, P., Kim, H. K., Zenker, S., Puyana, J. C., & Pinsky, M. R. (2008). Use of non-invasive NIRS during a vascular occlusion test to assess dynamic tissue O2 saturation response. *Intensive Care Medicine*, 34, 1600–1607. <http://doi.org/10.1007/s00134-008-1145-1>
- Grieger, S., Geraskin, D., Steimers, A., & Kohl-Bareis, M. (2013). Analysis of NIRS-based muscle oxygenation parameters by inclusion of adipose tissue thickness. In *Advances in experimental medicine and biology* (Vol. 789, pp. 131–6). http://doi.org/10.1007/978-1-4614-7411-1_18

- Gruartmoner, G., Mesquida, J., & Baigorri, F. (2013). Saturación tisular de oxígeno en el paciente crítico. *Medicina Intensiva*, 38(4), 240–248. <http://doi.org/10.1016/j.medin.2013.07.004>
- Hajime, M. (2013). Clinical Application of NIRS. In T. Jue & K. Masuda (Eds.), *Application of Near Infrared Spectroscopy in Biomedicine SE - 4* (Vol. 4, pp. 59–74). CHAP, Springer US. http://doi.org/10.1007/978-1-4614-6252-1_4
- Hamamatsu. (2012). NIRO Publications. Retrieved September 1, 2014, from http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/publications_list.pdf
- Haskell, R. C., Svaasand, L. O., Tsay, T. T., Feng, T. C., McAdams, M. S., & Tromberg, B. J. (1994). Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, 11(10), 2727–41. <http://doi.org/10.1364/JOSAA.11.002727>
- Horecker, B. L. (1942). The absorption spectra of hemoglobin and its derivatives in the visible and near infra-red regions. *Journal of Biological Chemistry*, 148, 173–183.
- Hyttel-Sørensen, S., Austin, T., van Bel, F., Benders, M., Claris, O., Dempsey, E. M., ... Greisen, G. (2013). Clinical use of cerebral oximetry in extremely preterm infants is feasible. *Dan Med J*, 60(1), A4533. <http://doi.org/A4533> [pii]
- ICNIRP. (1996). Guidelines on limits of exposure to laser radiation of wavelengths between 180 nm and 1,000 microm. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Physics*, 71(5), 804–19. <http://doi.org/10.1097/HP.0b013e3182983fd4>
- InSpectra™ StO₂ Tissue Oxygenation Monitor. (2010). Retrieved September 14, 2016, from <http://www.thinkmdi.net/products/nextpage.htm?PageDataID=23209>
- Jacques, S. L. (2013). Corrigendum: Optical properties of biological tissues: a review. *Physics in Medicine and Biology*, 58, 5007–5008. <http://doi.org/10.1088/0031-9155/58/14/5007>
- Jacques, S. L., & Pogue, B. W. (2008). Tutorial on diffuse light transport. *Journal of Biomedical Optics*, 13(August), 41302. <http://doi.org/10.1117/1.2967535>
- Jenkins, F. A., & White, H. E. (2001). *Fundamentals of Optics* (Fourth Edi).
- Jobsis, F. F. (1977). noninvasive infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science*, 1264–1267.
- Joy, P. S., & Patrick, H. (2007). NIRS tissue oxygenation compared to pulse oximetry in critically ill patients. *Chest*, 132(4_MeetingAbstracts), 569. JOUR. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1378/chest.132.4_MeetingAbstracts.569
- Kahn, S. (2015a). Hemoglobin. Retrieved from

<https://es.khanacademy.org/science/health-and-medicine/human-anatomy-and-physiology/introduction-to-hematologic/v/hemoglobin>

- Kahn, S. (2015b). Oxidative phosphorylation. Retrieved from <https://es.khanacademy.org/science/biology/cellular-respiration-and-fermentation/oxidative-phosphorylation/a/oxidative-phosphorylation-etc>
- Kassab, A. (2014). THE DESIGN AND DEVELOPMENT OF A NIRS CAP FOR BRAIN ACTIVITY MONITORING.
- Kienle, A., & Patterson, M. S. (1997). Improved solutions of the steady-state and the time-resolved diffusion equations for reflectance from a semi-infinite turbid medium. *Journal of the Optical Society of America B*, 14(1), 246–254.
- Lane, N. (2005). *Power, Sex, Suicide: Mitochondria and the meaning of life*. Oxford: Oxford University Press.
- Lane, N. (2015). *The Vital Question*. London: PROFILE BOOKS Ltd. Retrieved from www.profilebooks.com
- Leichtle, S. W., Kaoutzani, C., Brandt, M., Welch, K. B., & Purtil, M. (2013). Tissue oxygen saturation for the risk stratification of septic patients ☆, 28, 1–5.
- Levy, R. J., & Deutschman, C. S. (2007). Cytochrome c oxidase dysfunction in sepsis. *Critical Care Medicine*, 35(9 Suppl), S468-75. <http://doi.org/10.1097/01.CCM.0000278604.93569.27>
- Lima, A., & Bakker, J. (2011). Near-infrared spectroscopy for monitoring peripheral tissue perfusion in critically ill patients. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23(3), 341–351. <http://doi.org/S0103-507X2011000300013> [pii]
- Lipcsey, M., Woinarski, N. C., & Bellomo, R. (2012). Near infrared spectroscopy (NIRS) of the thenar eminence in anesthesia and intensive care. *Annals of Intensive Care*, 2(1), 11. <http://doi.org/10.1186/2110-5820-2-11>
- Loiacono, L. a., & Shapiro, D. S. (2010). Detection of Hypoxia at the Cellular Level. *Critical Care Clinics*, 26, 409–421. <http://doi.org/10.1016/j.ccc.2009.12.001>
- Lu, G., & Fei, B. (2014). Medical hyperspectral imaging: a review. *Journal of Biomedical Optics*, 19, 10901. <http://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.010901>
- Maikala, R. V. (2010). Modified Beer's Law - historical perspectives and relevance in near-infrared monitoring of optical properties of human tissue. *International Journal of Industrial Ergonomics*, 40(2), 125–134. <http://doi.org/10.1016/j.ergon.2009.02.011>
- Malatesta, F., Antonini, G., Sarti, P., & Brunori, M. (1995). Structure and function of a molecular machine: cytochrome c oxidase. *Biophysical Chemistry*, 54(1), 1–33.

[http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0301-4622\(94\)00117-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0301-4622(94)00117-3)

- Marcinek, D. J., Amara, C. E., Matz, K., Conley, K. E., & Schenkman, K. a. (2007). Wavelength shift analysis: a simple method to determine the contribution of hemoglobin and myoglobin to in vivo optical spectra. *Applied Spectroscopy*, 61(6), 665–9. <http://doi.org/10.1366/000370207781269819>
- Mason, M. G., Nicholls, P., & Cooper, C. E. (2014). Re-evaluation of the near infrared spectra of mitochondrial cytochrome c oxidase: Implications for non invasive in vivo monitoring of tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1837(11), 1882–1891. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.08.005>
- Matcher, S. J., Elwell, C. E., Cooper, C. E., Cope, M., & Delpy, D. T. (1995). Performance comparison of several published tissue near-infrared spectroscopy algorithms. *Analytical Biochemistry*. <http://doi.org/10.1006/abio.1995.1252>
- Mayeur, C., Campard, S., Richard, C., & Teboul, J.-L. (2011a). Comparison of four different vascular occlusion tests for assessing reactive hyperemia using near-infrared spectroscopy. *Critical Care Medicine*, 39(4). <http://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206d256>
- Mayeur, C., Campard, S., Richard, C., & Teboul, J.-L. (2011b). Comparison of four different vascular occlusion tests for assessing reactive hyperemia using near-infrared spectroscopy. *Critical Care Medicine*, 39(4), 695–701. <http://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318206d256>
- Mayevsky, A., & Pewzner, E. (2007). Apparatus and method for monitoring tissue vitality parameters. Retrieved from <http://www.google.com/patents/US20040054270>
- Mayevsky, A., Walden, R., Pewzner, E., Deutsch, A., Heldenberg, E., Lavee, J., ... Segal, E. (2011). Mitochondrial function and tissue vitality: bench-to-bedside real-time optical monitoring system. *Journal of Biomedical Optics*, 16(6), 67004. <http://doi.org/10.1117/1.3585674>
- Michel, H., Behr, J., Harrenga, a, & Kannt, a. (1998). Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 27, 329–56. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.329>
- Moerman, A., & Wouters, P. (2010). Near-infrared spectroscopy (NIRS) monitoring in contemporary anesthesia and critical care. *Acta Anaesthesiologica Belgica*, 61(4), 185–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388077>
- Murkin, J. M., & Arango, M. (2009). Near-infrared spectroscopy as an index of brain and tissue oxygenation. *British Journal of Anaesthesia*, 103 Suppl, i3-13. <http://doi.org/10.1093/bja/aep299>

- Nebout, S., & Pirracchio, R. (2012). Should We Monitor ScVO₂ in Critically Ill Patients? *Cardiology Research and Practice*, 2012(ii), 370697. <http://doi.org/10.1155/2012/370697>
- Nguyen, N. (2016). *HYPERSPECTRAL NEAR-INFRARED SPECTROSCOPY FOR THE ASSESSMENT OF SEPTIC PATIENTS*.
- NIRO 200 NX - Near Infrared Oxygenation Monitor: A highly functional tissue oxygenation monitor. (2015). Retrieved December 7, 2015, from <http://www.hamamatsu.com/us/en/product/alpha/N/C10448/index.html>
- Nonell, S., & Viappiani, C. (2015). BASIC SPECTROSCOPY. Retrieved March 3, 2015, from http://www.photobiology.info/Nonell_Viappiani.html#TOP
- Nosrati, R., Ramadeen, A., Hu, X., Woldemichael, E., Kim, S., Dorian, P., & Toronov, V. (2015). Simultaneous measurement of cerebral and muscle tissue parameters during cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. In *SPIE BiOS* (p. 93051G–93051G). CONF, International Society for Optics and Photonics.
- Ocean Optics. (2015). Retrieved September 24, 2015, from <http://oceanoptics.com/>
- Ortiz-Trujillo, I. C. (2012). *Diseño y Construcción de un equipo biomédico no invasivo que permita medir diferentes variables para determinar el nivel de oxigenación en la valoración del daño mitocondrial en pacientes críticos*.
- Pellicer, A., & Bravo, M. D. C. (2011). Near-infrared spectroscopy: a methodology-focused review. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 16(1), 42–9. <http://doi.org/10.1016/j.siny.2010.05.003>
- Pole, Y. (2002). Evolution of the pulse oximeter. *International Congress Series*, 1242, 137–144. [http://doi.org/10.1016/S0531-5131\(02\)00803-8](http://doi.org/10.1016/S0531-5131(02)00803-8)
- Professor Vladislav Toronov. (2015). Retrieved from <http://www.physics.ryerson.ca/user/25>
- QE65 Pro Data Sheet. (2015). Data Sheet, Ocean Optics. Retrieved from oceanoptics.com/wp-content/uploads/OEM-Data-Sheet-QE65Pro.pdf
- Rich, P. R. (2003). The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochemical Society Transactions*, 31, 1095–1105. <http://doi.org/10.1042/BST0311095>
- Richter, O.-M. H., & Ludwig, B. (2003). Cytochrome c oxidase — structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Vol. 147, pp. 47–74). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/s10254-003-0006-0>
- Riesz, J. (2007). The spectroscopic properties of melanin, (November), 1–239.

- Rodríguez, F., Barrera, L., De La Rosa, G., Dennis, R., Dueñas, C., Granados, M., ... Jaimes, F. (2011). The epidemiology of sepsis in Colombia: a prospective multicenter cohort study in ten university hospitals. *Critical Care Medicine*, *39*(7), 1675–1682. <http://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318218a35e>
- Ryan, T. E., Erickson, M. L., Brizendine, J. T., Young, H.-J., & McCully, K. K. (2012). Noninvasive evaluation of skeletal muscle mitochondrial capacity with near-infrared spectroscopy: correcting for blood volume changes. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985), *113*(2), 175–83. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00319.2012>
- Sakr, Y. (2010). Techniques to assess tissue oxygenation in the clinical setting. *Transfusion and Apheresis Science*, *43*(1), 79–94. <http://doi.org/10.1016/j.transci.2010.05.012>
- Sandby-Moller, J., Poulsen, T., & Wulf, H. C. (2003). Epidermal Thickness at Different Body Sites: Relationship to Age, Gender, Pigmentation, Blood Content, Skin Type and Smoking Habits. *Acta Dermato-Venereologica*, *83*(6), 410–413. <http://doi.org/10.1080/00015550310015419>
- Scheeren, T. W. L., Schober, P., & Schwarte, L. A. (2012). Monitoring tissue oxygenation by near infrared spectroscopy (NIRS): background and current applications. In *Journal of Clinical Monitoring and Computing* (Vol. 26, pp. 279–287). <http://doi.org/10.1007/s10877-012-9348-y>
- Scholkmann, F., Kleiser, S., Metz, A. J., Zimmermann, R., Mata Pavia, J., Wolf, U., & Wolf, M. (2014). A review on continuous wave functional near-infrared spectroscopy and imaging instrumentation and methodology. *NeuroImage*, *85 Pt 1*, 6–27. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.004>
- Serway, R. a, & Jewett, J. W. (2008). *Física para ciencias e ingeniería con Física Moderna. Volumen 2.*
- Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (2002). *Near-Infrared Spectroscopy.*
- Simonson, S. G., & Piantadosi, C. A. (1996). Near-infrared spectroscopy: Clinical applications. *Critical Care Clinics*, *12*(4), 1019–1029.
- Simonson, S. G., Welty-Wolf, K., Huang, Y. T., Griebel, J. a, Caplan, M. S., Fracica, P. J., & Piantadosi, C. a. (1994). Altered mitochondrial redox responses in gram negative septic shock in primates. *Circulatory Shock*, *43*(1), 34–43. article. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/7982271>
- Skarda, D. E., Mulier, K. E., Myers, D. E., Taylor, J. H., & Beilman, G. J. (2007). Dynamic near-infrared spectroscopy measurements in patients with severe sepsis. *Shock* (Augusta, Ga.), *27*(4), 348–353. <http://doi.org/10.1097/01.shk.0000239779.25775.e4>

- Sliney, D. H. (1997). Optical radiation safety of medical light sources. *Physics in Medicine and Biology*, 42(5), 981. article. Retrieved from <http://stacks.iop.org/0031-9155/42/i=5/a=016>
- Stewart, A. D., & Sutton, L. (2012). *Body Composition in Sport, Exercise and Health*.
- Toronov, V. (2015). Determination of Tissue Oxigenation and metabolism by Near Infrared Spectrsocopy. Technical Talk, Medellin, Colombia.
- Treacher, D. F., & Leach, R. M. (1998). Oxygen transport-1. Basic principles. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 317(7168), 1302–1306. <http://doi.org/10.1136/bmj.317.7168.1302>
- van Beekvelt, M. C., Borghuis, M. S., van Engelen, B. G., Wevers, R. A., & Colier, W. N. (2001). Adipose tissue thickness affects in vivo quantitative near-IR spectroscopy in human skeletal muscle. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 101(1), 21–28. <http://doi.org/10.1042/CS20000247>
- Vo-Dinh, T. (2003). *Biomedical Photonics Handbook. Biomedical Photonics*. <http://doi.org/10.1117/1.1776177>
- Wariar, R., Gaffke, J. N., Haller, R. G., & Bertocci, L. A. (2000). A modular NIRS system for clinical measurment of impaired skeletal muscle oxygenation, 315–325.
- Wolf, M., Naulaers, G., van Bel, F., Kleiser, S., & Griesen, G. (2012). Review: A review of near infrared spectroscopy for term and preterm newborns. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20(1), 43. <http://doi.org/10.1255/jnirs.972>
- Wyatt, J. S., Cope, M., Delpy, D. T., Richardson, C. E., Edwards, a D., Wray, S., & Reynolds, E. O. (1990). Quantitation of cerebral blood volume in human infants by near-infrared spectroscopy. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 68(32), 1086–1091.
- Yeganeh, H. Z., Toronov, V., Elliott, J. T., Diop, M., Lee, T.-Y., & St Lawrence, K. (2012). Broadband continuous-wave technique to measure baseline values and changes in the tissue chromophore concentrations. *Biomedical Optics Express*, 3(11), 2761–70. <http://doi.org/10.1364/BOE.3.002761>
- Yücel, M. a., Selb, J., Boas, D. a., Cash, S. S., & Cooper, R. J. (2014). Reducing motion artifacts for long-term clinical NIRS monitoring using collodion-fixed prism-based optical fibers. *NeuroImage*, 85(JUNE 2013), 192–201. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.06.054>
- Zijlstra, W. G., & B., O. (1989). Definition and notation of hemoglobin oxygen saturation. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*.
- Zonios, G., & Dimou, A. (2009). Light scattering spectroscopy of human skin in vivo.

Optics Express, 17(3), 1256–1267. <http://doi.org/10.1364/OE.17.001256>

Apéndice A

BREVE CRONOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LA ESPECTROSCOPIA APLICADA A MEDICIONES MÉDICAS.

En 1860, Kirchhoff y Bunsen inventaron el espectroscopio, que medía las longitudes de onda exactas de los espectros de emisión en las que los elementos colocados en llamas de un mechero de Bunsen emitían radiación (Pole, 2002). En 1862 Hoppe-Seyler en Alemania describió el espectro de la oxihemoglobina (HbO_2) y en 1864 Stokes en el Reino Unido hizo lo propio con el de la deoxihemoglobina (Hb) estableciendo la importancia de la hemoglobina en el transporte de oxígeno. En 1876 von Vierordt, también en Alemania, analizó tejidos, midiendo los cambios espectrales de la luz cuando penetraba los tejidos cuando se ocluía la circulación de sangre. En 1894 Hüfner en Alemania determinó mediante métodos espectroscópicos las cantidades absolutas y relativas de HbO_2 y HHb in vitro. (Scholkmann et al., 2014)

MacMunn descubre el Citocromo en 1884, en 1925 Keilin redescubre el proceso, identifica el citocromo e identifica individualmente los citocromos a, b y c. Identificó los dos grupos hemo a y a3 (ya había usado términos a1 y a2 en otro pigmentos de bacterias)(Rich, 2003).

En 1935 Karl Matthes, profesor de fisiología en Viena creó un equipo que utilizando dos longitudes de onda medía continuamente la saturación de oxígeno a nivel arterial in vivo para sangre humana, explicando que “luz roja puede pasar por la HbO_2 pero la hemoglobina reducida la absorbe”, publicando más de 20 artículos sobre el tema, lo que le valió ser reconocido como el padre de la oximetría.

Las primeras aplicaciones de la espectroscopia para determinar la respiración de los tejidos, fueron hechos por Chance y Williams (Chance & Williams, 1955). Estos dos fisiólogos midieron suspensiones de mitocondrias aisladas en diferentes estados dentro del ciclo respiratorio. Encontraron dificultades al interpretar los espectros, debido al importante efecto de la dispersión, pero tuvieron la intuición de asociar los cambios espectrales con el ciclo metabólico del oxígeno.

En el campo de la física la teoría del transporte radiativo fue presentada a mediados del siglo XX, por S. Chandrasekhar (Chandrasekhar, 1960), a partir de la teoría de transporte de Boltzman. En su forma general describe la propagación de la radiación electromagnética en un medio y considera los efectos emisión, absorción y dispersión. Con un numero de aplicaciones amplio en varios campos la solución analítica de esta ecuación es compleja; en el caso de tejidos la aproximación por difusión, permite describir cuantitativamente el transporte de la luz en los tejidos(Sergio Fantini et al., 1994).

Lübbers contribuyó a la espectroscopia por reflectancia in-vivo al establecer medidas en un ancho de banda amplio en el rango visible para enzimas de la cadena respiratoria (Cope, 1991). Su trabajo incorporó análisis de componentes múltiples mediante regresión por mínimos cuadrados a un campo que hasta el momento trabajaba con medidas de 2 o 3 longitudes de onda.

En 1972 Takuo Aoyagi logró eliminar el componente no pulsátil de la sangre arterial(Aoyagi, 2003) - la saturación base presente en los tejidos – lo que permitió calibrar las medidas de oximetría, al liberar el componente pulsátil para determinar la saturación arterial de O_2 . Este paso logró la primera aplicación clínica de las técnicas espectroscópicas de medición de oxigenación y el transporte del oxígeno.

En 1977 Jobsis presentó su trabajo de observación continua y no invasiva del comportamiento de las variables de concentración de HbO_2 y HHb ($[\text{HbO}_2]$ y $[\text{HHb}]$) y citocromo en el cerebro de gatos,

confirmando su idea de la transparencia de los tejidos incluido el cráneo en el rango del infrarrojo cercano. Por esto es considerado el padre de la espectroscopia NIRS. (Jobsis, 1977)

Sin embargo se necesitó más de una década para que el potencial de la espectroscopia NIR empezara a rendir frutos(Blanco & Villarroya, 2002). El desarrollo de componentes ópticos y electrónicos que elevaron el nivel de sensibilidad instrumental, sumado al incesante crecimiento del poder de los computadores modernos facilitó su inserción dentro del abanico de herramientas con que la ciencia cuenta para desentrañar los misterios de la vida.

Apéndice B

ACUERDO DE CONFIDENCIALIDAD

Acuerdo protocolizado entre la Universidad Pontificia Bolivariana y la Universidad de Ryerson, respecto al uso del algoritmo usado en esta investigación.

MUTUAL NON-DISCLOSURE AGREEMENT

This Mutual Non-Disclosure Agreement ("AGREEMENT")
is made between the following parties (individually "PARTY" or collectively "PARTIES")

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA, NIT 890902922-6, represented by President Pbro. JULIO JAIRO CEBALLOS SEPÚLVEDA, identity card number 8.354.986, with legal address in Medellín, Colombia, hereinafter the "UNIVERSITY",

Ryerson University, represented by Senior Director, Applied Research and Commercialization, JENNIFER MACINNIS, with legal address in 350 Victoria Street, Toronto, Ontario, Canada M5B 2K3, hereinafter the "INSTITUTION",

WHEREAS,

the Parties may disclose Confidential Information to each other in connection with the Authorized Purpose

NOW THEREFORE,

it is hereby agreed as follows

AGREEMENT SPECIFIC INFORMATION

Effective Period: 1st October 2014 to 30 September, 2015

Authorized purpose: Use of proprietary algorithms to process NIRS signals applied to live tissue.

Confidentiality Period: From the Effective Date and up to five (5) years beyond the expiry of this Agreement

CLAUSES

1. For the purpose of this Agreement "Confidential Information" shall mean all information (including but not limited to any knowledge, know-how, trade secrets, technological and commercial information or information related to a device, software or any other creative work or invention, whether or not subject to or capable of protection by copyright, patent, trademark or other intellectual property rights) which relates to the Authorized Purpose and is disclosed by or on behalf of one Party ("Disclosing Party") to the other Party ("Receiving Party") in whatever form (including but not limited to in writing, orally, electronically or by observation).

2. The Receiving Party:
 - a) shall not use Confidential Information for any purpose other than the Authorized Purpose; and
 - b) shall not disclose Confidential Information to any third party or person, without the prior and written authorization of the Disclosing Party; and
 - c) shall protect Confidential Information against disclosure to third parties or persons with the same degree of care with which the Receiving Party protects its own confidential information but with not less than a reasonable degree of care; and
 - d) shall limit the circulation of Confidential Information to such employees of the Receiving Party that have a need to know Confidential Information in connection with the Authorized Purpose, warning them of the confidential nature of the information provided.

These obligations shall be in force for the duration of the Confidentiality Period.

3. Information disclosed shall not be regarded as Confidential Information to the extent that the Receiving Party can prove that the information:
 - a) is or becomes published or otherwise generally available to the public without violation of this Agreement; or
 - b) is already known to the Receiving Party at the time of disclosure; or
 - c) is lawfully obtained by the Receiving Party from a third party without any restrictions on confidentiality; or
 - d) is developed by the Receiving Party without any use of Confidential Information.

If the Receiving Party is required, pursuant to an administrative or a judicial action or subpoena, to disclose Disclosing Party's Confidential Information, Receiving Party shall have the right to make such disclosure, provided to the extent it is lawfully allowed to do so, it shall prior to any such disclosure notify the Disclosing Party and give the Disclosing Party the opportunity to seek any legal remedy it considers necessary to protect its Confidential Information.

4. Nothing herein contained shall be construed as an obligation of any Party to disclose or accept any disclosure of Confidential Information.
5. All Confidential Information disclosed under this Agreement shall remain the property of the Disclosing Party. Except as expressly set forth in this Agreement, no other rights or licenses to Confidential Information is granted by the Disclosing Party to the Receiving Party.
6. Upon the Disclosing Party's request, the Receiving Party shall return all Confidential Information and any copies thereof without undue delay to the Disclosing Party, or certify destruction of the same.

- 7. The Receiving Party shall be responsible for the actions and omissions of its employees regarding Confidential Information.
- 8. A Party may not transfer or assign any of its rights and/or obligations under this Agreement to a third party or person without the prior consent of the other Party.
- 9. This Agreement shall be governed and construed in accordance with the laws of Canada.
- 10. All disputes arising out of or in connection with this Agreement, which cannot be solved amicably, shall be finally settled under the Rules of Arbitration of the International Chamber of Commerce by one or more arbitrators appointed in accordance with said Rules or, if so chosen by the plaintiff, in the applicable court of the defendant's place of residence. The award of the arbitration will be final and binding upon the Parties. Nothing in this Agreement shall limit the Parties' right to seek temporary injunctive relief or to enforce an arbitration award in any applicable competent court of law.

AS WITNESS,
 the Parties have caused this Agreement to be duly signed by the undersigned authorized representatives of the Parties.

THE UNIVERSITY

Signature *Julio Santos Alvarez*
 Name _____
 ID card _____
 Phone _____
 E-mail _____



THE INSTITUTION

Signature *JM*
 Name Jennifer MacInnis

Phone 416 979 5000 Ext 4602
 E-mail jmacinnis@ryerson.ca

Apéndice C

ECUACIÓN DEL TRANSPORTE RADIATIVO

El tratamiento de la difusión de la luz en medios turbios (como es el caso de los tejidos en el cuerpo humano) ha sido estudiado de diversas maneras. Su modelación numérica se ha hecho de manera equivalente mediante simulaciones tipo Monte Carlo o de manera analítica mediante la ecuación de transporte radiativo.

El análisis de Monte Carlo es un análisis exacto, donde se llevan a cabo simulaciones del camino dentro del medio a considerar, que puede tener en cuenta variaciones espaciales de los parámetros de absorción y dispersión. Su principal desventaja es el tiempo de cómputo requerido para producir soluciones con una relación adecuada de señal a ruido. (Cope, 1991)

En su teoría del transporte radiativo, Chandrasekhar utilizó la ecuación de transporte de Boltzman para describir los fenómenos de absorción y dispersión en un medio (Chandrasekhar, 1960; Vo-Dinh, 2003). Esta teoría hace uso de la naturaleza probabilística de dicha ecuación y resuelve el problema de transporte de forma vectorial. Así mismo ignora todos los fenómenos de onda, como la polarización y la interferencia. El énfasis entonces es en el componente difuso del transporte de la luz. Este término difuso es el opuesto a coherente con el que a menudo se describe un haz de luz. En estos términos se habla de una reflectancia difusa, que surge de la dispersión de la luz que entra bajo la superficie del medio. Esta reflectancia es distinta a la reflexión que describe Fresnel en la óptica geométrica clásica. La radiación difusa “reflejada” del tejido contiene información que ha muestreado en su camino aleatorio de dispersión por las estructuras internas que constituyen el medio (tejidos). Y los cambios en el tiempo de la reflectancia difusa permiten hacer un seguimiento a especies moleculares absorbentes como puede ser la hemoglobina oxigenada.

Una forma sencilla de explicar la dispersión es considerar la luz incidente como una onda plana con amplitud perpendicular a la dirección de propagación. Dada la diferencia de índice de refracción entre los dos materiales (el medio y el dispersor) ocurrirá la dispersión del haz de fotones. Tal como ocurre en un tejido celular donde a nivel de la célula la diferencia de índice de refracción entre citosol (medio) y organelas (dispersores) también presenta esta misma característica (Vo-Dinh, 2003).

La ecuación de transporte radiativo no puede ser resuelta en la mayoría de los casos prácticos, por lo tanto a menudo es necesario considerar una aproximación. Uno de estos enfoques simplificados es la ecuación de difusión, válida en el régimen de dispersión fuerte ($\mu_a \ll \mu_s$). Esta aproximación predice con precisión cercana a la de las simulaciones hechas por el método de Monte Carlo, siempre y cuando la distancia entre fuente y fronteras de los medios sea superior a la distancia de camino-libre-medio del fotón (MFP por sus siglas en inglés). (Sergio Fantini et al., 1994)

Un medio que contiene una distribución uniforme de dispersores, se caracteriza por un coeficiente de dispersión,

$$\mu_s = \rho \sigma_s \quad 13 \quad [cm^{-1}]$$

Donde ρ es la densidad numérica de los dispersores y σ_s es el área perpendicular a la dirección de desplazamiento de la luz y que está definida como la relación de la potencia redirigida en el espacio (energía por segundo) sobre la intensidad que incide (energía por segundo por unidad de área).

$$\sigma_s = \frac{P_s}{I_0} \quad 14 \quad [cm^2]$$

De forma similar a las relaciones 6 y 7 se puede definir la absorción de la energía de la luz por medio de las especies moleculares absorbentes. Si se considera una potencia de absorción P_{abs} se puede obtener en los mismos términos de la ecuación 7 un área perpendicular de absorción σ_a que nos permite obtener,

$$\mu_a = \rho\sigma_a \quad 15 \quad [cm^{-1}]$$

Un parámetro esencial para el funcionamiento de la teoría de transporte radiativo y su aproximación por difusión es el coeficiente de anisotropía g adimensional, expresado como el coseno promedio del ángulo de dispersión (Haskell et al., 1994). Este parámetro expresa la capacidad de un medio para dispersar la radiación direccionalmente. En tejidos, los valores experimentales muestran que el parámetro se encuentra entre 0.44 - 0.99, lo que indicaría una tendencia a la dispersión en ángulos muy cercanos al del desplazamiento del haz (Vo-Dinh, 2003). En un proceso de difusión a través de los tejidos, la luz se dispersa de forma aleatoria, moviéndose en los tejidos en una serie de tramos cortos de dirección y longitud aleatoria. Este proceso se conoce como dispersión isotrópica, descrita por el coeficiente de dispersión reducida, relacionado con los parámetros anteriores así:

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s \quad 16 \quad [cm^{-1}]$$

Cuando la absorción es lo suficientemente baja para permitir la difusión de un haz de luz en el medio, como en el caso del rango infrarrojo en tejidos, la dispersión se convierte en el fenómeno dominante de transporte. Aunque los fotones se muevan en una forma aleatoria, logran atravesar el tejido. Este régimen se caracteriza porque la relación $\mu_s \gg \mu_a$ se cumple.

La relación derivada de la ecuación de transferencia radiativa por medio de la aproximación por difusión⁷ tiene la siguiente forma (Sergio Fantini et al., 1994):

$$\frac{\delta U}{\delta t} - vD\nabla^2 U + v\mu_a U = q_0 \quad 17$$

Donde:

- U es la densidad total de fotones.
- v es velocidad de la luz en el medio = c/n donde c es velocidad de la luz en el vacío y n es el índice de refracción del medio.
- D es el coeficiente de difusión de fotones, definido así,

⁷ El término difusión es análogo al concepto expresado por la ley de Fick, en el que se describe la difusión unidimensional de un soluto en un solvente (Barret et al., 2010). Aquí se trata con el caso de la difusión isotrópica en un medio tridimensional (Haskell et al., 1994; Vo-Dinh, 2003). La analogía más cercana en términos comunes sería pensar en la difusión de una gota de tinta en un vaso de agua.

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu_s)} \quad 18 \quad [cm]$$

Si se aplican las condiciones de frontera y se satisfacen las condiciones de isotropía limite, se puede derivar una expresión para el flujo continuo de fotones ψ [W/cm²] en un medio casi infinito y homogéneo (Yeganeh et al., 2012)

$$\psi = \frac{2}{(4\pi)^2} \frac{S \exp[-\rho(\mu_a)^{1/2}]}{D \rho^3} \left[1 + \rho \left(\frac{\mu_a}{D} \right)^{1/2} \right] (Z_0 + Z_b) \left[z + 3D \left[1 - \frac{(Z_0 + Z_b)^2 + 3z^2}{2\rho^2} \left\{ 3 + \frac{\rho^2 \mu_a}{D} \right\} \right] \right] \quad 19$$

Donde:

S es la potencia de la fuente [fotones / s.]

ρ distancia fuente-detector [cm] (Distinto al parámetro utilizado en las ecuaciones 6 y 8).

z_0 y z_b parámetros de aproximación de frontera, definidos así:

$$z_0 = 3D \quad 20$$

$$z_b = \frac{1+R_{eff}}{1-R_{eff}} 2D \quad 21$$

R_{eff} Representa la fracción de fotones que es reflejada internamente en la frontera

La ciencia óptica del desplazamiento de la luz en material turbio, usa una ecuación cuya derivación es empírica, conocida como ley de potencia, que permite definir la dispersión causada por los tejidos en el rango de 400 – 1300 nm (Jacques, 2013; Zonios & Dimou, 2009),

$$\mu'_s(\lambda) = M \left(\frac{\lambda}{800} \right)^{-\alpha} \quad 22 \quad [cm^{-1}]$$

Donde M y α son parámetros característicos de cada tipo de tejido.

El coeficiente de absorción puede ser calculado de la siguiente manera (Yeganeh et al., 2012),

$$\mu_a = [HbO_2] \varepsilon(\lambda)_{HbO_2} + [HHb] \varepsilon(\lambda)_{HHb} + (\%FC_{H_2O}) \mu_a + (\%FC_{fat}) \mu_{fat} \quad 23 \quad [cm^{-1}]$$

Donde [HbO₂] y [HHb] son las concentraciones de la hemoglobina Oxigenada y desoxigenada respectivamente. μ_a y μ_{fat} son los coeficientes de absorción del agua y la grasa respectivamente y (%FC) es su fracción de volumen.

Apéndice D

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PACIENTES PARTICIPANTES EN ESTE ESTUDIO.

Consentimiento informado

Investigadores: Grupo Biología de Sistemas de la Universidad Pontificia Bolivariana.

Lugar donde se realiza el estudio: Unidad de Cuidados Intensivos de la Clínica Universitaria Bolivariana

A usted quien representa al paciente _____ se le está invitando a participar en el estudio de investigación: "Diseño y construcción de un equipo biomédico no invasivo que permita medir diferentes variables para determinar el nivel de oxigenación en la valoración del daño mitocondrial en pacientes críticos". El proyecto hace referencia a una serie de eventos que se originan por una infección y que posteriormente afectan varios órganos y sistemas, produciendo en ellos daños que requieren manejo médico especializado, los cuales podrían llegar a detectarse mediante el uso de equipos como el que se propone construir.

Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes aspectos. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Justificación del estudio:

Las infecciones pueden llevar a situaciones críticas donde todo el organismo se ve afectado. Se ha visto en estudios anteriores que pacientes que tienen infecciones muy serias, como su familiar, algunas veces presentan lesiones de órganos vitales a pesar de haberseles suministrado la terapia de acuerdo con las guías actuales.

Las células que conforman los órganos están constituidas por diferentes estructuras, una de ellas se llama mitocondria y cumple funciones importantes que se pueden afectar por la infección severa. Los cambios de las mitocondrias pueden estudiarse con pruebas que muestren alteración en su estructura y funcionamiento, para comprender por qué se mueren algunas células en el cuerpo y por qué fallan algunos órganos. A través de este estudio se propone buscar ciertas señales o marcadores generados por la mitocondria que nos puedan ayudar en un futuro a detectar más tempranamente este tipo de problemas con la expectativa de que estos hallazgos puedan orientar a futuro su tratamiento.

Objetivo del estudio: construir un equipo que utiliza luz para medir cómo están funcionando las mitocondrias en pacientes hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos con infección grave.

Procedimiento del estudio: en caso de aceptar la participación en el estudio, al paciente se le tomará una muestra de sangre para analizar en el laboratorio el daño de las mitocondrias. Adicionalmente, en el laboratorio, se utilizará el equipo en construcción para determinar en la muestra de sangre, si este equipo puede detectar también el daño de las mitocondrias. También se tomarán algunos datos de la historia clínica.

Beneficios del estudio: el principal beneficio de este estudio es el conocimiento que se generará y que podrá utilizarse a futuro a favor de los pacientes que tienen una condición similar a su familiar o acompañante. En este caso su familiar no se verá beneficiado directamente.

Riesgos asociados con el estudio: La participación en el estudio no implica ningún riesgo adicional. La toma de muestra de sangre se realizará a través del dispositivo (catéter o aguja) que se les pone a todos los pacientes que están en la unidad de cuidados intensivos en una vena para la toma de muestras y seguimiento diario que le hacen de rutina en cualquier institución. Esto quiere decir que a su familiar o acompañante no se le chuzará (inyectar) y por lo tanto, no sufrirá

molestias derivadas de este procedimiento. Este procedimiento será realizado por un profesional del área de la salud con amplia experiencia en la toma de muestras en especial en pacientes en estado crítico.

Procedimientos alternativos: actualmente la única forma de evaluar el daño en las mitocondrias es con las técnicas que se le realizan a la prueba de sangre.

INFORMACIÓN ADICIONAL

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para su familiar o acompañante, si usted decide negarse en nada cambiará la atención clínica que recibirá su familiar o acompañante.
- Si decide participar en el estudio, usted puede retirar la autorización en el momento que lo desee, la cual será respetada en su integridad y no se le presionará para que cambie de decisión. Con ello, ni usted ni su familiar tendrá perjuicio alguno. La atención médica y paramédica continúa en igualdad de condiciones y las intervenciones rutinarias para el manejo de la enfermedad continuará sin deterioro alguno.
- Los procedimientos de muestra de sangre y su análisis para este estudio no tendrá ningún costo para usted ni su familiar o acompañante.
- No recibirá pago por la participación de su familiar ni acompañante.
- Si en el transcurso o al final del estudio, usted o su familiar tiene alguna inquietud al respecto o desea solicitar información adicional o conocer los resultados del estudio, podrán contactar al investigador responsable de este estudio: Dr. Jorge Bejarano, teléfono 4455925.

La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. No se publicará el nombre, el documento de identidad, la dirección o el número telefónico o cualquier otra fuente de datos de identificación en ninguno de los espacios de socialización de la investigación, esto incluye las presentaciones futuras que se realicen sobre los resultados de la investigación o publicaciones.

Si tiene alguna pregunta relacionada con la investigación por favor hágala que con mucho gusto se la resolveremos. Si por el contrario todo le ha quedado claro acerca del estudio, y está de acuerdo con que su familiar o acompañante participe en este estudio, por favor proceda a firmar el Consentimiento Informado.

Estoy de acuerdo en que mi familiar participe en este estudio y para constancia firmo a continuación.

Nombre _____ CC _____

Relación con el paciente: _____

Testigo 1. _____ CC _____

Testigo 2. _____ CC _____

Medellín, _____